

UNTERSUCHUNGEN ZUR MULTIPLIZITÄT
DER METHIONINSPEZIFISCHEN
TRANSFER-RIBONUKLEINSÄUREN
IN BRAUEREIHEFE UND BESTIMMUNG DER
PRIMÄRSTRUKTUR DER
NICHTINITIIERENDEN $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ AUS HEFE

Hartmut Gruhl

1975

UNTERSUCHUNGEN ZUR MULTIPLIZITÄT DER METHIONINSPE-
ZIFISCHEN TRANSFER-RIBONUKLEINSÄUREN IN BRAUEREIHEFE

UND

BESTIMMUNG DER PRIMÄRSTRUKTUR DER
NICHTINITIIERENDEN $\text{trNA}_3^{\text{Met}}$ AUS HEFE

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

des Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Hartmut Gruhl

aus Herrsching a.A.

München 1975



1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Feldmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 18. 12. 1975

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München in der Zeit vom Januar 1971 bis Juli 1975 ausgeführt.

Ergebnisse aus dieser Arbeit wurden teilweise veröffentlicht:

Feldmann, H., Harring, H. und Gruhl, H. (1971)

Z. Physiol. chem. 352, 1231-1247

Fradin, A., Gruhl, H. und Feldmann, H. (1975)

FEBS Letters 50, 185-189

Gruhl, H. und Feldmann, H. (1975) FEBS Letters im Druck

Herrn Prof. Dr. H. Feldmann danke ich vielmals für die Förderung dieser Arbeit. Den Kollegen der Abteilung danke ich für anregende Diskussionen.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	1
1.1. Allgemeine Bedeutung der Transfer-Ribonukleinsäuren	1
1.2. Biosynthese der tRNAs	2
1.3. Funktion der tRNAs in der Proteinbiosynthese	5
1.4. Multiplizität der tRNAs	6
1.5. Die Rolle der methioninspezifischen tRNAs in der Proteinbiosynthese	9
1.5.1. Die methioninspezifischen tRNAs in Prokaryonten	9
1.5.2. Die methioninspezifischen tRNAs in Eukaryonten	10
1.5.3. Problemstellung	11
2. Untersuchungen zur Multiplizität der methioninspezifischen tRNAs in Brauereihefe	14
2.1. Reinigung von tRNA ₃ ^{Met}	14
2.1.1. Säulenchromatografien	14
2.1.2. Prüfung des Reinheitsgrades der isolierten tRNA ₃ ^{Met}	22
2.1.2.1. Reinigung der Methionyl-tRNA-Synthetase	23
2.1.2.2. Renaturierung der tRNA ₃ ^{Met}	23
2.1.2.3. Beladung der tRNA ₃ ^{Met} mit anderen Aminosäuren	23
2.2. Spaltung der tRNA _{1,2,3} ^{Met} mit RNAase T ₁ und Analyse der Spaltprodukte	24
2.2.1. Spaltung der tRNA _{1,2,3} ^{Met} mit RNAase T ₁	24

2.2.2. Analyse der T ₁ -Oligonukleotide	28
2.3. Bestimmung des Dihydrouridingehaltes in tRNA ₁ ^{Met} und tRNA ₃ ^{Met}	29
2.4. Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Experimenten zur Untersuchung der Multiplizität der methionin- spezifischen tRNAs in Brauereihefe	30
3. Ermittlung der Primärstruktur von tRNA ₃ ^{Met} aus Braue- reihefe	33
3.1. Reinigung von ³² P-markierten tRNAs ^{Met}	33
3.1.1. Vorversuche zur Reinigung der tRNAs ^{Met}	34
3.1.1.1. Auftrennung der tRNAs nach Tener	34
3.1.1.2. Analytische Säulenchromatografien an BD-Cellu- lose pH 3.0 und pH 5.0	37
3.1.1.3. Beladung der gereinigten tRNAs ^{Met} mit ¹⁴ C- Methionin	39
3.1.1.4. Bestimmung der Position der unbeladenen tRNA ^{Met} im Elutionsprofil der BD-Cellulose Säule pH 3.0	40
3.1.2. Präparative Säulenchromatografien von ³² P-mar- kierter tRNA	42
3.2. Bestimmung der Nukleotidsequenz von tRNA ₃ ^{Met}	45
3.2.1. Kurze Beschreibung der Techniken nach Sanger et al.	46
3.2.2. Enzymatische Spaltungen von ³² P-tRNA ₃ ^{Met}	47

	Seite
3.2.3. Ermittlung der Nukleotidsequenzen der T_1 -Oligonukleotide	50
3.2.4. Ermittlung der Nukleotidsequenzen der RNAase A-Oligonukleotide	55
3.2.5. Partialsplaltung von $tRNA_3^{Met}$ mit RNAase T_1	72
3.2.6. Auftrennung der Partialsplaltprodukte	73
3.2.6.1. Entwicklung eines zweidimensionalen Gelelektrophoreseverfahrens	73
3.2.6.2. Homochromatografie	75
3.2.7. Bestimmung der seltenen Nukleotide	78
3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Versuchen zur Ermittlung der Primärstruktur von ^{32}P - $tRNA_3^{Met}$	79
4. Diskussion	82
4.1. Diskussion der Primärstrukturen methioninspezifischer tRNAs	82
4.1.1. Die Primärstruktur von $tRNA_3^{Met}$	82
4.1.2. Vergleich der Primärstrukturen von $tRNA_3^{Met}$ und der Initiator- $tRNA_1^{Met}$ aus Brauereihefe	83
4.1.3. Vergleich der Primärstrukturen der nichtinitilierenden $tRNA_3^{Met}$ aus E. coli, Hefe und Säugetier	84
4.2. Das Erkennungsproblem	87
4.2.1. Die Erkennungsregion der Aminoacyl-tRNA-Synthetase	87

	Seite
4.2.2. Die Erkennungsregion der Faktoren der Proteinbiosynthese	92
4.3. Evolutionsaspekte	93
5. Zusammenfassung der Ergebnisse	95
6. Methoden	101
6.1. Methoden zu den Untersuchungen der Multiplizität der methioninspezifischen tRNAs in Brauereihefe	101
6.2. Methoden zu den Versuchen zur Bestimmung der Primärstruktur der tRNA ₃ ^{Met}	108
7. Materialien	117
8. Literaturverzeichnis	121
9. Verzeichnis der Abkürzungen	129

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Bedeutung der Transfer-Ribonukleinsäuren

Die biologische Information ist in der Basenfolge von Nukleinsäuren niedergelegt. Der genetische Speicher ist die DNA. Von ihr werden ausgewählte Abschnitte in eine arbeitsfähige Matrize, die mRNA, übertragen (Transkription). Das biochemisch wirksame Genprodukt ist das jeweilige Protein, dessen spezifische Funktion durch eine bestimmte Folge von Aminosäuren festgelegt ist. Die Mittlerrolle bei der Informationsübertragung zwischen Gen und der ihm entsprechenden Wirkungseinheit, dem Protein, übernehmen die tRNAs, indem sie die in die mRNA-Sequenz überschriebene Information des Gens in die Aminosäuresequenz des Proteins umsetzen (Translation).

tRNAs sind kleine RNAs, ca. 75-85 Nukleotide lang, was einem Molekulargewicht von 25-30 000 dalton entspricht. Auffallend ist ihr hoher Gehalt an seltenen Basen im Vergleich zu anderen Klassen von RNAs. Die Primärstrukturen vieler tRNAs, sowohl aus prokaryontischen wie aus eukaryontischen Organismen, wurden in den letzten Jahren aufgeklärt (1). Obwohl weitgehende Sequenzunterschiede bestehen, lassen sich alle Primärstrukturen in der von Holley (2) vorgeschlagenen Kleeblattform schreiben. Vieles deutet darauf hin, daß auch die Tertiärstrukturen der tRNAs weitgehend ähnlich sind (3-7).

Ihre Hauptaufgabe erfüllen die tRNAs als Adaptormoleküle in der

ribosomalen Proteinbiosynthese, doch sind auch andere Funktionen bekannt geworden. Sie werden später kurz beschrieben.

1.2. Biosynthese der tRNAs

Die tRNAs werden an der DNA transkribiert. Ihre Gene liegen - je nach Organismus - in einfachen oder mehreren Kopien vor. Es sind auch Genome bekannt, welche die Cistren für mehrere tRNAs mit verschiedener Aminosäurespezifität zusammenfassen (8). Wie bei allen RNAs, entstehen auch bei der Transkription der tRNA Gene zunächst Vorstufen ("precursor") mit zusätzlichen Nukleotidsequenzen an beiden Enden. Diese pre-tRNAs unterliegen einem Reifungsvorgang, der durch spezifische Enzyme katalysiert wird (Übersichten: 8, 9). Dieser Prozeß wurde eingehend an *E. coli* untersucht; die hier gefundenen Mechanismen scheinen größtenteils auch für andere Organismen gültig zu sein (9). Der Reifungsvorgang läßt sich in drei Stufen gliedern:

1) Schneiden der Polynukleotidkette am 5'- und 3'-Ende. An beiden Enden müssen überschüssige Nukleotide entfernt werden. Am 5'-Ende übernimmt dies in *E. coli* eine Endonuklease P (10), am 3'-Ende eine Exonuklease II (11, 12). Schließlich konnte eine RNAase P₂ aus *E. coli* isoliert werden, welche polycistronische pre-tRNAs in monocistronische spaltet (13).

2) Modifizierungen der Nukleoside. Ein hoher Prozentsatz der Nukleotide in der reifen tRNA ist modifiziert. Diese Modifizie-

rungen erfolgen durch spezifische Enzyme, welche entweder die Base oder die Ribose verändern. Bis heute sind ca. 50 verschiedene seltene Basen bekannt (1). Sie entstehen im häufigsten Fall durch Methylierungen, jedoch sind auch sehr komplizierte Strukturen wie etwa das Nukleosid Y in mehreren phenylalaninspezifischen tRNAs bekannt (14). Die Modifizierungen erfolgen posttranskriptional, teils am precursor, zT. aber auch erst an der fertig geschnittenen tRNA. Erwähnt werden soll noch, daß gleichartige Modifizierungen, wie z.B. die Umwandlung von U in ψ , an verschiedenen Stellen der tRNA Sequenz durch verschiedene Enzyme erfolgen können (15).

Über die Funktion der seltenen Nukleoside weiß man noch sehr wenig. Bemerkenswert ist, daß Untermodifizierung von tRNAs nicht zu einem vollständigen Verlust ihrer Funktion in der Proteinbiosynthese führen muß (16, 17), und E. coli Mutanten, deren tRNAs das Nukleosid T fehlt, noch lebensfähig sind (18, 19). Dies bedeutet, daß die Zelle im Bezug auf das Ausmaß der Modifizierungen von tRNAs eine relativ große Toleranz aufweist. Es fällt auf, daß die meisten Modifizierungen bevorzugt in nicht gepaarten Bereichen zu finden sind, und gleiche, seltene Nukleoside meist an identischen Positionen in den verschiedenen tRNAs auftreten. Ferner wurde die Gesetzmäßigkeit erkannt, daß tRNAs mit einem A als 3. Buchstaben im Anticodon meist ein i^6A oder sm^2i^6A , tRNAs mit einem U in der gleichen Position jedoch ein t^6A benachbart haben. Letzterer Befund war für diese Arbeit von Interesse, da das Anti-

codon für Methionin CAU lautet. Inwieweit diesen Gesetzmäßigkeiten eine Rolle für die Funktion der tRNAs zukommt, bleibt offen.

Seltene Basen im Anticodon können die Auswahl der möglichen Codons einschränken (z.B. s^2am^5C in $tRNA_{\text{3}}^{\text{Glu}}$ aus Hefe (20)) oder erweitern (z.B. I in $tRNA_{1,2}^{\text{Ser}}$ aus Hefe (21)). Noch ist unklar, welche Bedeutung dies für die Zelle hat.

Lediglich einzelne spezielle Modifikationen konnten bisher mit einer bestimmten Funktion in Verbindung gebracht werden. So sind die beiden Nukleotide Pseudouridin im Anticodonbereich der $tRNA^{\text{His}}$ wesentlich für die Regulation des Histidin Operons in *S. thyphimurium*, an der die beladene $tRNA^{\text{His}}$ beteiligt ist (22). m^2G in Position 10 in tRNAs soll die Aktivität der Phenylalanyl-tRNA-Synthetase erhöhen (23). Möglicherweise kommt einzelnen Modifikationen eine Bedeutung für die Erkennung der tRNA durch die richtige Aminoacyl-tRNA-Synthetase und bei der Verhinderung von Falschbeladungen zu.

3) Ausbildung des 3'-terminalen $-CpCpA_{OH}$. Immer noch unklar ist, ob in jedem Fall dieses allen tRNAs gemeinsame 3'-Ende durch die Nukleotidyl-Transferase nachträglich angehängt wird. Die bisher sequenzierten pre-tRNAs aus *E. coli* (24, 25) enthalten bereits das Trinukleosiddiphosphat $-CpCpA$, während es den precursor-tRNAs des T_4 Phagen (26) fehlt und somit später hinzugefügt werden muß. Vermutlich erfolgt der Reifungsprozeß in diesem Punkt nicht einheitlich.

Ein wesentlicher Gesichtspunkt in der Betrachtung des Maturationsvorganges ist die Tatsache, daß reife tRNAs relativ stabile Moleküle darstellen, hingegen pre-tRNAs sehr schnell von unspezifischen RNAasen angegriffen werden. Reifung bedeutet deshalb auch Umwandlung eines instabilen in einen stabilen Metaboliten.

1.3. Funktion der tRNAs in der Proteinbiosynthese

Ihre wichtigste Aufgabe erfüllen die tRNAs im Prozeß der ribosomalen Proteinsynthese, die in den Grundzügen aufgeklärt werden konnte. Viele Schritte sind in ihrem genauen Mechanismus jedoch noch undurchsichtig (Übersichten: 27-30). Der Ablauf der Proteinbiosynthese läßt sich in drei Abschnitte gliedern: 1) Initiation 2.) Polypeptidkettenverlängerung und 3.) Termination. Da die ribosomale Proteinbiosynthese an Prokaryonten besser studiert ist, wird im folgenden das Prinzip für diese Organismen beschrieben. Es sei jedoch hervorgehoben, daß dieser Vorgang in Eukaryonten zumindest in den wesentlichen Punkten ähnlich verläuft.

1) Initiation. Zunächst wird ein sogenannter Initiationskomplex aus der 30S Untereinheit des Ribosoms, mRNA und formyl-methionyl-tRNA^{Met}_f (fmet-tRNA^{Met}_f: Das tiefgestellte f bedeutet formylierbare met-tRNA^{Met}). Das Symbol wurde später für alle Initiator-tRNAs übernommen, auch wenn sie im nichtformylierten Zustand initiieren (s. Kap. 1.5.). Hierzu sind drei Initiationsfaktoren nötig (IF-1, IF-2, IF-3). Mit der Anlagerung der großen ribosomalen 50S Unter-

einheit ist der Initiationskomplex vollendet. Die $\text{fmet-tRNA}_f^{\text{Met}}$ befindet sich im Donorbezirk (Peptidylort) des Ribosomenkomplexes.

2) Polypeptidkettenverlängerung. Die Verlängerung der Polypeptidkette läßt sich wiederum in drei Schritte zerlegen: (a) Bindung von Aminoacyl-tRNA im Akzeptorbezirk (Aminoacylort) des Ribosoms unter Beteiligung des Elongationsfaktors EF-T, (b) Knüpfung der Peptidbindung durch die Peptidyltransferase, einem Protein der 50S ribosomalen Untereinheit, (c) Translokation der Peptidyl-tRNA vom Akzeptor - zum Peptidylort unter gleichzeitiger Eliminierung der freiwerdenden tRNA. An diesem Schritt, der unter Spaltung von 2 Molekülen GTP verläuft, ist der Elongationsfaktor EF-G beteiligt. Im Akzeptorbezirk kann nun eine neue Aminoacyl-tRNA binden.

3.) Termination. Die Termination der Proteinsynthese erfolgt, wenn ein Terminationscodon der mRNA im Akzeptorbezirk erscheint. Die Peptidyltransferase wird durch Terminationsfaktoren R aktiviert und spaltet nun die an der letzten tRNA gebundene Polypeptidkette ab. Die Proteinsynthese ist damit abgeschlossen.

1.4. Multiplizität der tRNAs

Für jede Aminosäure ist mindestens eine spezifische tRNA vorhanden. Im allgemeinen findet man jedoch mehrere tRNAs für die gleiche Aminosäure (Isoakzeptoren), was als Multiplizität bezeichnet wird.

Eine funktionelle Notwendigkeit für Isoakzeptoren ergibt sich aus der Degeneration des genetischen Codes: Mehrere Codons für eine Aminosäure verlangen mehrere tRNAs zum Ablesen dieser Codons.

Eine Einschränkung erfährt diese Aussage durch die "Wobble-Hypothese" von Crick. Nicht alle möglichen Codons werden in gleicher Häufigkeit verwendet, zudem scheinen die Zellen aus ökonomischen Gründen die tRNAs nur in dem Ausmaß zu produzieren, wie sie benötigt werden. Anzahl, Art und Menge der Isoakzeptoren sind daher für jeden Zelltyp charakteristisch.

Ein gutes Beispiel hierfür sind spezialisierte Zellen, welche nur wenige Proteine synthetisieren. Man fand, daß in diesen Zellen die tRNA-Population mit der Aminosäurezusammensetzung der Proteine korreliert (Beispiele: Retikulozyten von Kaninchen (31) und Spinnrüsen von *Bombyx mori* (32)). Unterschiedliche tRNA-Muster fand man weiterhin für folgende Fälle: (a) Kulturen, die unter verschiedenen Wachstumsbedingungen gezogen wurden (33, 34), (b) für Zellen in unterschiedlichen Entwicklungszuständen (z.B. Sporen und vegetative Zellen in *B. subtilis* (35), Kotyledonen und adulte Pflanzen von Sojabohnen (36)), (c) in Zellen aus verschiedenen Geweben des gleichen Organismus (z.B. Muskel und Linse vom Rind (37)), (d) in Tumorzellen im Vergleich zu normal regulierten Zellen (38), (e) in Zellen nach Virusinfektion (z.B. T₄-Phagen in *E. coli* (38, 39)). Zu beachten ist ferner, daß einige Zellorganellen, wie Mitochondrien oder Chloroplasten, eine von der des Cytosols verschiedene tRNA-Population aufweisen (40-42). Die an-

gegebenen Beispiele zeigen deutlich, daß das tRNA-Muster dem Funktionszustand der Zellen angepaßt ist.

Isoakzeptoren besitzen unterschiedliche Primärstrukturen. Dies wurde durch Sequenzbestimmungen vielfach bewiesen. Da es für die Mehrzahl der untersuchten Fälle nicht erlaubt ist, Isoakzeptoren lediglich als Varianten einer einzigen, für eine bestimmte Aminosäure spezifischen tRNA anzusehen, sollte es möglich sein, den unterschiedlichen Strukturen auch verschiedene Funktionen zuzuordnen. Dies ist bisher nur in wenigen Fällen gelungen. Als solche sind zu nennen:

(a) tRNAs mit Funktionen außerhalb der ribosomalen Proteinbiosynthese: Hierzu gehören tRNAs, die an der Zellwandsynthese (43-45) oder an der Bildung von Aminoacyl-phosphatidylglycerin (46, 47) beteiligt sind. Ferner konnte gezeigt werden, daß aminoacylierte tRNAs für das endständige Anheften einer Aminosäure an Proteine beteiligt sind (48-58).

(b) Suppressor-tRNAs (Übersicht: 59): Mutationen, die zu einer Codonveränderung in der mRNA führen, können durch tRNAs ($tRNA_{su}^{+}$) suprimiert werden. Diese Suppressor-tRNAs entstehen selbst u.a. durch Mutation in einem tRNA Gen, wodurch es zu einem definierten Nukleotidaustausch, meist im Anticodon, kommt (60, 61). Dadurch ist es der $tRNA_{su}^{+}$ möglich, mit dem durch Mutation veränderten Codon der mRNA zu paaren und die ihr entsprechende Aminosäure zu transferieren.

Man kennt tRNAs, die Unsinn-, "missense"- als auch Rastermutatio-

nen suprimieren. Für einige sind die vollständigen Nukleotidsequenzen ermittelt worden (1).

(c) tRNAs, die an der Regulation der zugehörigen Aminosäure beteiligt sind. Eine solche Beteiligung konnte eindeutig für tRNA^{His} aus *E. coli* und *S. thyphimurium* gezeigt werden (62, 63), für andere tRNAs wird es vermutet (64-69). Zu betonen ist aber, daß diese Art der Regulation eines Aminosäureoperons kein allgemeingültiges Prinzip darstellt (70-73).

(d) Methioninspezifische tRNAs. Eine besondere Stellung unter den tRNAs nehmen die methioninspezifischen ein. Zwei Klassen von tRNAs wurden gefunden, die eine unterschiedliche Funktion in der Proteinsynthese übernehmen. Die methioninspezifischen tRNAs waren für die Problemstellung dieser Arbeit von besonderer Bedeutung. Sie werden daher im nächsten Abschnitt ausführlicher behandelt.

1.5. Die Rolle der methioninspezifischen tRNAs in der Proteinbiosynthese

1.5.1. Die methioninspezifischen tRNAs in Prokaryonten

Als diese Arbeit begonnen wurde, war über die methioninspezifischen tRNAs in Prokaryonten bereits einiges bekannt. Zwei Gruppen von tRNAs^{Met} existieren in jedem Organismus. Eine tRNA übernimmt den Kettenstart der Proteinsynthese (tRNA^{Met}_f), eine zweite (tRNA^{Met}_m) ist für den Einbau von Methionin in interne Positionen der wachsenden Peptidkette verantwortlich (74). Die Initiation

erfolgt durch formyl-methionyl-tRNA_f^{Met} (75, 74). Eine Ausnahme hierzu wurde später für das Bakterium *Streptococcus faecalis* gefunden, wenn es im folatfreien Medium angezogen wird. Dann erfolgt die Initiation durch nicht formylierte met-tRNA^{Met} (76-78).

Auch in anderen prokaryontischen Systemen wie Mitochondrien (79-81), Chloroplasten (82-84) und *Mycoplasma* (85, 86) erfolgt die Initiation der Proteinsynthese durch formylierte met-tRNA_f^{Met}.

Die Diskriminierung zwischen den beiden Klassen von tRNA^{Met} erfolgt einerseits durch Initiationfaktoren, zum anderen durch das Ribosom und die mRNA. Nur die Initiator-tRNAs bilden mit IF-2 einen Komplex der spezifisch an den Donorbezirk des Ribosoms gebunden wird (27).

Schließlich waren zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit die Primärstrukturen von *E. coli* tRNA_f^{Met} (87) und tRNA_m^{Met} (88) bekannt.

1.5.2. Die methioninspezifischen tRNAs in Eukaryonten

Die Erforschung dieser tRNAs lag noch in den Anfängen. In mehreren eukaryontischen Organismen wurden multiple tRNA^{Met}-Spezies gefunden (84, 89-93, 81, 94-97). Im Jahre 1970 wurden erste Berichte veröffentlicht, die darauf hindeuteten, daß die Proteinsynthese auch in Eukaryonten mit Methionin beginnt (98-101) und hierfür eine spezielle Initiator-tRNA vorhanden ist (91, 102-

104). Es konnte gezeigt werden, daß in Eukaryonten die Initiation der Proteinsynthese in vivo ausschließlich ohne Formylgruppe erfolgt, wenngleich viele eukaryontische met-tRNA_f^{Met} durch bakterielle Aminoacyl-tRNA-Transformylase formyliert werden können (84, 89-94, 105).

An der Aufklärung der Struktur der Initiator-tRNA_f^{Met} aus Bäckerhefe wurde gearbeitet (102).

1.5.3. Problemstellung

In Anknüpfung an das vorher Gesagte ergaben sich für uns folgende Fragestellungen: 1.) Wieviele methioninspezifische tRNAs gibt es in Eukaryonten? 2.) Wie unterscheiden sich die Primärstrukturen dieser Isoakzeptoren? 3.) Welche Funktionen üben diese tRNAs^{Met} aus? 4.) Welche Ähnlichkeiten bestehen zwischen prokaryontischen und eukaryontischen tRNAs^{Met}? 5.) Welche Aussagen lassen sich aus Strukturvergleichen zwischen den tRNAs^{Met} über tRNA-Enzym-Wechselwirkungen machen?

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurde als eukaryontisches System Brauereihefe gewählt, da sie einen relativ einfach zu handhabenden Organismus darstellt, der zudem genetisch gut definiert ist und in Kultur leicht gewonnen werden kann. Takeishi et al. (89) und RajBhandary et al. (90) beschrieben die Existenz von zwei verschiedenen tRNAs^{Met} in Bäckerhefe. Im Unterschied dazu fanden Gillam et al. (106) und Feldmann et al. (107) in Brauerei-

hefe vier verschiedene tRNA^{Met}, drei Hauptspezies und eine minore Komponente (Abb. 1).

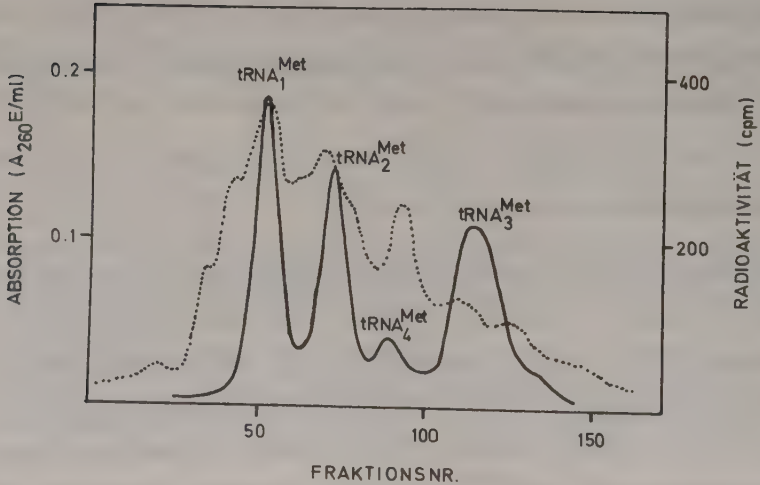


Abb. 1: Säulenchromatografie von tRNA aus Brauereihefe an BD-Cellulose.

25 A_{260E} mit ¹⁴C- Methionin beladene und 75 A_{260E} unbeladene tRNA (Boehringer) wurden zusammen an einer BD-Cellulose Säule, wie unter 6.1.1.2. beschrieben, chromatografiert.

..... Absorption bei 260 nm, ————— ¹⁴C-Radioaktivität

Die Experimente dieser Arbeit beschäftigten sich mit drei Hauptthemen:

- 1.) Isolierung und Reinigung der drei methioninspezifischen Hauptspezies mit Schwerpunkt auf der nichtinitiiierenden $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$.
- 2.) Charakterisierung dieser isoakzeptierenden tRNAs durch Spaltung mit RNAase T_1 .
- 3.) Vollständige Bestimmung der Primärstruktur von $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$.

Gleichzeitig zu unseren Untersuchungen an Hefe wurde in anderen Laboratorien an weiteren eukaryontischen Systemen gearbeitet. Ihre Ergebnisse werden später zusammen mit den von uns gefundenen diskutiert.

2. Untersuchungen zur Multiplizität der methioninspezifischen tRNAs in Brauereihefe

2.1. Reinigung von $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ aus Brauereihefe

2.1.1. Säulenchromatografien

Zur Reindarstellung von $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ wurden mehrere säulenchromatografische Systeme getestet. BD-Cellulose (106), DEAE Sephadex, RPC 3 und RPC 4 (108) Säulen wurden in verschiedenen Kombinationen herangezogen. Nach jedem Säulenlauf wurde im Eluat die Absorption bei 260 nm gemessen und die Akzeptoraktivität für Methionin (s. 6.1.3.) in den Fraktionen bestimmt. Diejenigen Fraktionen, welche $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ enthielten, wurden vereinigt, am Rotationsverdampfer eingengt und die tRNA mit Alkohol gefällt. Zur Kontrolle des Anreicherungsgrades wurde außerdem die Akzeptoraktivität für Methionin in dem nach einer Chromatografie insgesamt erhaltenen $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ Material bestimmt. Als Maß für die Akzeptoraktivität und damit des Anreicherungsgrades diente der Einbau von pMol radioaktiv markiertem Methionin pro A_{260}^E tRNA.

Als günstigste Anreicherungsmethode für $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ erwies sich eine Säulenkombination in der oben angegebenen Reihenfolge. Ein typischer Arbeitsgang wird im folgenden beschrieben. Säulengröße, Äquilibrierungspuffer und alle die Elution betreffenden Daten sind im Abschnitt 6.1.1. in übersichtlicher Form angegeben. Im Verlauf des Textes wird deshalb auf die Methodik nicht mehr ein-

gegangen, sondern auf den entsprechenden Absatz im Kapitel 6 verwiesen.

Im ersten Schritt wurde das tRNA Gemisch an BD-Cellulose chromatografiert, da hierbei die $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ von den übrigen isoakzeptierenden $\text{tRNAs}^{\text{Met}}$ abgetrennt wird. 25 000 $\text{A}_{260}^{\text{E}}$ tRNA (Boehringer) in 50 ml Startpuffer wurden auf eine Säule, wie unter 6.1.1.1. beschrieben, aufgetragen und mit einem Salzgradienten eluiert (Abb. 2). Die Fraktionen mit der höchsten Akzeptoraktivität für Methionin wurden vereinigt (Fraktionen 210 - 230 in Abb. 2). Sie zeigten eine Beladbarkeit von 70 $\text{pMol}/\text{A}_{260}^{\text{E}}$. $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ Fraktionen aus mehreren BD-Cellulose Säulenläufen wurden gesammelt. Dies ergab 18 000 $\text{A}_{260}^{\text{E}}$, die in 50 ml Startpuffer gelöst an einer DEAE Sephadex Säule (s. 6.1.1.3.) chromatografiert wurden (Abb. 3). Wiederum wurden die Fraktionen mit der höchsten Akzeptoraktivität für Methionin (Fraktionen 390 - 450 in Abb. 3) vereinigt. Dies ergab 2050 $\text{A}_{260}^{\text{E}}$, die Akzeptoraktivität lag nun bei 160 $\text{pMol}/\text{A}_{260}^{\text{E}}$. Zur weiteren Anreicherung wurde die $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ Fraktion in 25 ml Äquilibriumspuffer für das RPC 3 System aufgenommen und an RPC 3, wie in 6.1.1.4. angegeben, chromatografiert (Abb. 4). Die Fraktionen 360 - 390 (Abb. 4) wurden vereinigt. Es wurden 216 $\text{A}_{260}^{\text{E}}$ $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ Fraktion erhalten, die mit 375 $\text{pMol}/\text{A}_{260}^{\text{E}}$ beladbar war. Der letzte Reinigungsschritt wurde an einer RPC 4 Säule vollzogen (Abb. 5). Das aus der Chromatografie an RPC 3 gewonnene tRNA Material wurde in 8 ml Startpuffer gelöst und an RPC 4, wie in 6.1.1.5 beschrieben, getrennt. Es ergab sich ein scharfer

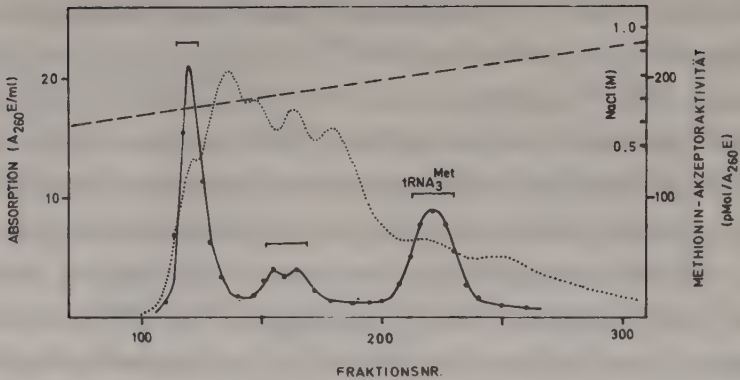


Abb. 2: Chromatografie von tRNA aus Brauereihefe an BD-Cellulose. 25 000 A₂₆₀^E tRNA (Boehringer) wurden an einer BD-Cellulosesäule, wie unter 6.1.1.1. beschrieben, chromatografiert.

.....: Absorption bei 260 nm, ———: Akzeptoraktivität für Methionin, - - - - -: Verlauf des Salzgradienten

Die durch Klammern angezeigten tRNA^{Met}₃ Fraktionen wurden zum Zwecke der weiteren Anreicherung vereinigt.

Gipfel im Absorptionsprofil, der mit dem Akzeptorgipfel für Methionin zusammenfiel. Es konnten 50 A₂₆₀^E tRNA^{Met}₃ isoliert wer-

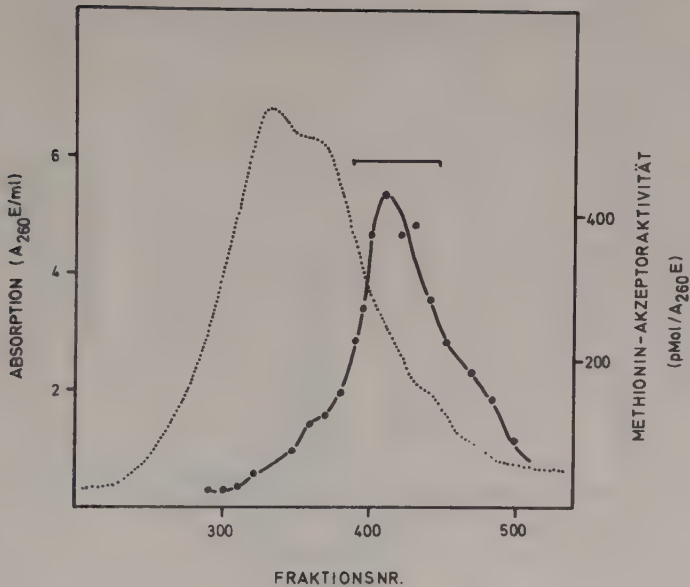


Abb. 3: Chromatografie der tRNA^{Met}₃ Fraktion aus der BD-Cellulose Säule (Abb. 2) an DEAE Sephadex

18 000 A₂₆₀^E tRNA wurden an einer DEAE Sephadex Säule, wie unter 6.1.1.3. beschrieben, chromatografiert.

.....: Absorption bei 260 nm, ———: Akzeptoraktivität für Methionin

Die in Klammer gesetzten Fraktionen wurden vereinigt.

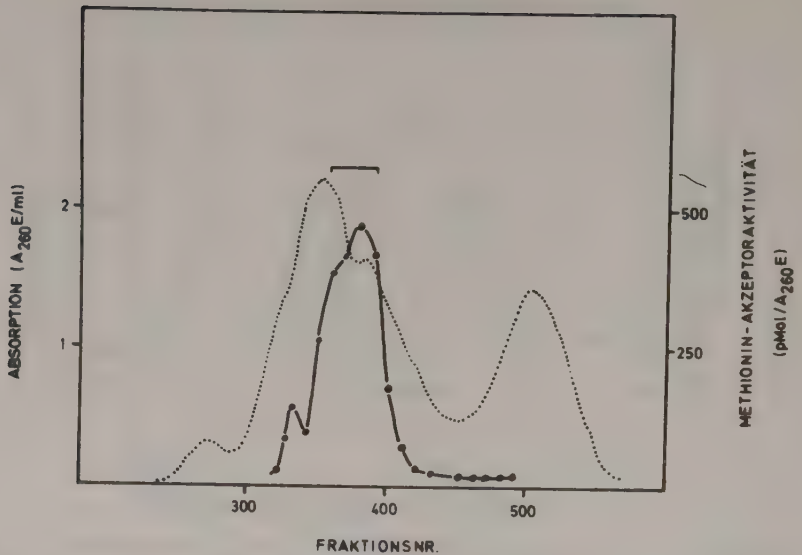


Abb. 4: Chromatografie der tRNA^{Met}₃ Fraktion aus der DEAE Sephadex Säule (Abb. 3) an RPC 3

2050 A_{260E} tRNA wurden an einer RPC 3 Säule, wie unter 6.1.1.4. beschrieben, chromatografiert.

.....: Absorption bei 260 nm, ———: Akzeptoraktivität für Methionin

Die in Klammer gesetzten Fraktionen wurden vereinigt.

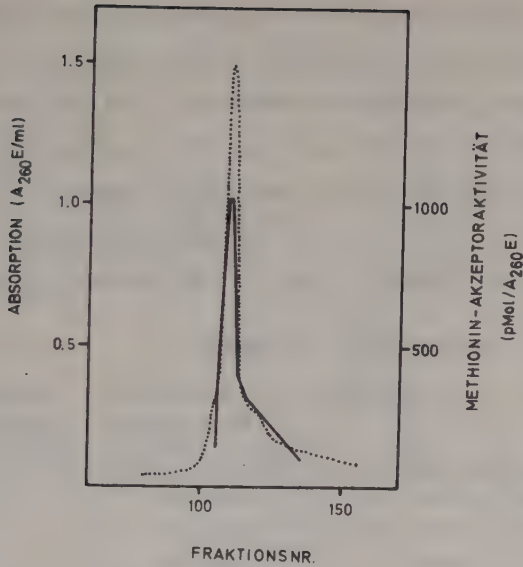


Abb. 5: Chromatografie der tRNA₃^{Met} Fraktion aus der RPC 3 Säule (Abb. 4) an RPC 4

216 A₂₆₀^E tRNA wurden an einer RPC 4 Säule, wie unter 6.1.1.5. beschrieben, chromatografiert.

.....: Absorption bei 260 nm, ———: Akzeptoraktivität für Methionin

den, die spezifische Akzeptoraktivität wurde zu $875 \text{ pMol/A}_{260}^{\text{E}}$ in den vereinigten Fraktionen (Frakt. 108-112 in Abb. 5) bestimmt.

Tabelle 1 faßt die Daten zur Reindarstellung von $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ zusammen. Die Angaben zur Akzeptoraktivität beziehen sich auf die nach jedem Säulenlauf vereinigten Fraktionen, die zur Erzielung einer größeren Ausbeute relativ breit geschnitten werden mußten. Die Spitzenfraktionen hatten eine wesentlich höhere Akzeptoraktivität (Vgl. Abb. 2-5). In der letzten Säulenchromatografie (RPC 4) wurde für die Fraktion 110 in Abb. 5 $1200 \text{ pMol/A}_{260}^{\text{E}}$ gefunden.

Tabelle 1: Reindarstellung von $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$

Säulentyp	Chomatogramm	vereinigte Fraktionen	Akzeptoraktivität in den vereinigten Frakt.
BD-Cellulose	Abb. 1	210-230	70
DEAE Sephadex	Abb. 2	390-450	160
RPC 3	Abb. 3	360-390	375
RPC 4	Abb. 4	108-112	875

Zur Kontrolle, ob es sich bei dem in vier säulenchromatografischen Schritten isolierten Material noch um $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ handelt, wurde eine Probe hiervon mit ^{14}C -Methionin beladen und zusammen mit einem tRNA Gemisch (Boehringer), das vorher mit ^3H -Methionin beladen worden war, an einer BD-Cellulose Säule (s. 6.1.1.2.) co-chromatografiert. Wie man in Abb. 6 sieht, fallen der ^{14}C -Gipfel der Probe mit dem ^3H -Gipfel der unfractionierten $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ Fraktion

zusammen, d.h. es handelt sich bei dem isolierten tRNA Material tatsächlich um $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$.

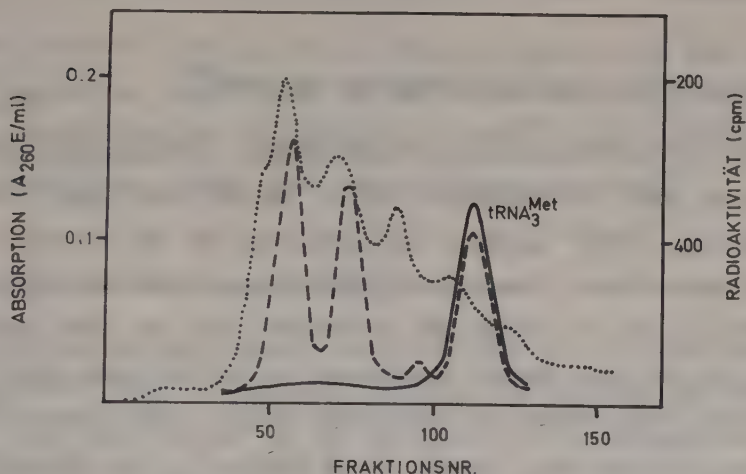


Abb. 6: Analytische Säulenchromatografie von gereinigter $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ an BD-Cellulose

65 $A_{260\text{E}}$ tRNA (Boehringer), 25 $A_{260\text{E}}$ mit ^3H -Methionin beladene tRNA (Boehringer) und 10 $A_{260\text{E}}$ mit ^{14}C -Methionin beladene $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ wurden an einer BD-Cellulose Säule, wie unter 6.1.1.2. beschrieben, chromatografiert.

.....: Absorption bei 260 nm, ———: ^{14}C -Radioaktivität,
 - - - -: ^3H -Radioaktivität

Die beiden anderen methioninspezifischen tRNAs aus Brauereihefe $\text{tRNA}_1^{\text{Met}}$ und $\text{tRNA}_2^{\text{Met}}$ wurden durch ähnliche säulenchromatografische Schritte gereinigt. Die Methoden sind in (107) ausführlich beschrieben.

2.1.2. Prüfung des Reinheitsgrades von $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$

Bevor an die Ermittlung der Primärstruktur herangegangen werden konnte, mußte sichergestellt werden, daß die nach obiger Methode gewonnene $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ genügend hoch gereinigt war. Die Beladung unter den beschriebenen Standardbedingungen ergab einen zu niedrigen Wert als für eine reine tRNA zu erwarten wäre (ca. 1400 pMol/ $\text{A}_{260}^{\text{E}}$). Es wurde deshalb untersucht, ob die Methionin-Akzeptoraktivität durch veränderte Bedingungen erhöht werden konnte. Zu geringe Beladung kann folgende Gründe haben: (1.) Die verwendete Synthetase hat eine ungenügende Enzymaktivität (2.) Die tRNA ist teilweise denaturiert, d.h. sie hat die für ihre biologische Funktion wesentliche Tertiärstruktur verloren (109) (3.) Die tRNA bildet Aggregate (4.) Die tRNA hat am 3'-Ende teilweise Nukleotide verloren. Um diese Möglichkeiten zu prüfen, wurden folgende Versuche durchgeführt:

Zu 1.) Methionyl-tRNA-Synthetase wurde gereinigt und anschließend im Beladungstest für $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ verwendet.

Zu 2.) und 3.) Es wurden Renaturierungsversuche durchgeführt

Zu 4.) Die Renaturierungsexperimente wurden unter Zusatz von CTP

ausgeführt (ATP ist im Standardgemisch zur Bestimmung der Aminosäureakzeptoraktivität bereits enthalten!).

2.1.2.1. Reinigung von Methionyl-tRNA-Synthetase

Heferohextrakt wurde mit 45-55 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gefällt und über Amberlite Säulen fraktioniert. Mit der so gewonnenen angereicherten Synthetase wurde die Beladbarkeit der $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ erneut getestet. Die Ergebnisse zeigten keine höhere Beladung der $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$.

2.1.2.2. Renaturierung der $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$

Die Renaturierungsversuche wurden wie unter 6.1.11. beschrieben ausgeführt. Dabei zeigte sich, daß weder durch Renaturierung allein noch durch Zugabe von CTP die Methionin-Akzeptoraktivität erhöht wird. Deshalb können Denaturierung oder unvollständiges CCA-Ende nicht als Gründe für die zu geringe Beladung der $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ angesehen werden.

2.1.2.3. Beladung der $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ mit anderen Aminosäuren

Da ein Ziel dieser Arbeit die Sequenzierung von $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ war, ging es vor allem darum, festzustellen, in welcher Menge eventuell noch andere tRNAs in der gereinigten $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ enthalten waren. Aus diesem Grunde wurde die $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ mit einem radioaktiv markierten

Algenproteinhydrolysat beladen. Das verwendete Hydrolysat enthielt alle Aminosäuren, Methionin jedoch nur in einem Anteil von 0.6 %. Zudem wurde nichtradioaktives Methionin im Überschuß zugesetzt. Der Versuch wurde unter Standardbedingungen (s. 6.1.3.) durchgeführt. Es konnte keine Beladung mit anderen Aminosäuren festgestellt werden. Damit war ausgeschlossen, daß die $\text{tRNA}_{3}^{\text{Met}}$ Fraktion andere tRNAs in nennenswerter Menge enthielt.

2.2. Spaltung der $\text{tRNA}_{1,2,3}^{\text{Met}}$ mit RNAase T_1 und Analyse der Spaltprodukte

2.2.1. Spaltung der $\text{tRNA}_{1,2,3}^{\text{Met}}$ mit RNAase T_1

Das Oligonukleotidmuster nach einer Spaltung mit T_1 -Enzym ist ein Kriterium dafür, ob eine tRNA für die Sequenzbestimmung geeignet ist. Aus bekannten T_1 -Spaltmustern weiß man, daß sich reine tRNA durch eine limitierte Anzahl von T_1 -Oligonukleotiden (ca. 15) und einen niedrigen Untergrund im Absorptionsprofil einer zur Auftrennung der Spaltprodukte verwendeten DEAE Cellulose Säule auszeichnet.

20 $\text{A}_{260}^{\text{E}}$ $\text{tRNA}_{3}^{\text{Met}}$ wurden, wie in 6.1.5. beschrieben, mit RNAase T_1 gespalten und an DEAE Cellulose (s. 6.1.1.6.) chromatografiert. Abb. 7 zeigt das Chromatogramm dieses Säulenlaufes. Auf Grund der oben gegebenen Kriterien war daraus zu ersehen, daß die $\text{tRNA}_{3}^{\text{Met}}$ zu ca. 90 % rein war.

Ebenso wie $\text{tRNA}_{3}^{\text{Met}}$ wurden auch die gereinigten $\text{tRNA}_{1}^{\text{Met}}$ und

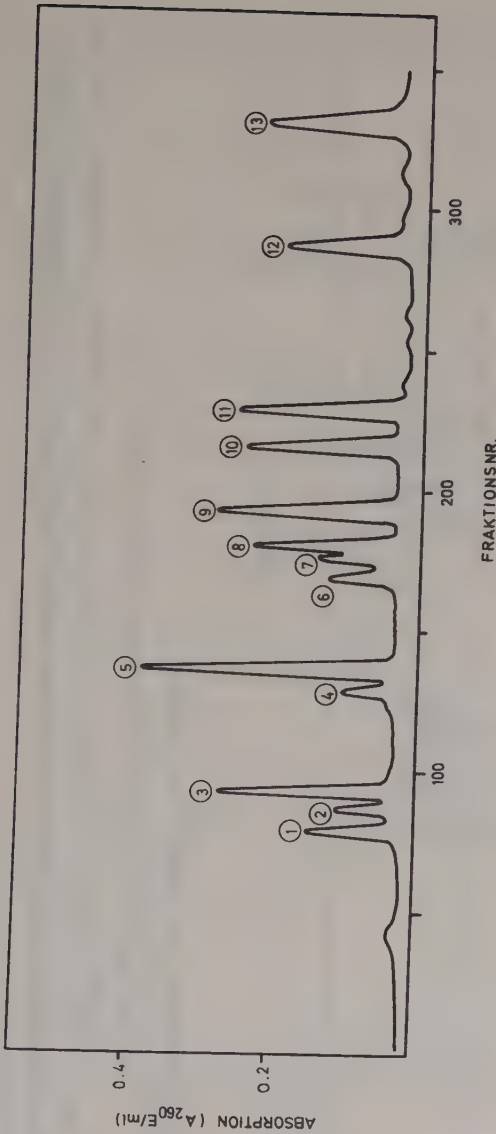


Abb. 7: Spaltung von tRNA^{Met}₁ mit RNAase T₁

Chromatografie der Spaltprodukte an DEAE Cellulose
20 A_{260E} tRNA^{Met}₁ wurden, wie unter 6.1.5. beschrieben, mit RNAase T₁ gespalten, und die Oligonukleotide an einer DEAE Cellulose Säule, wie unter 6.1.1.6. angegeben, chromatografiert.

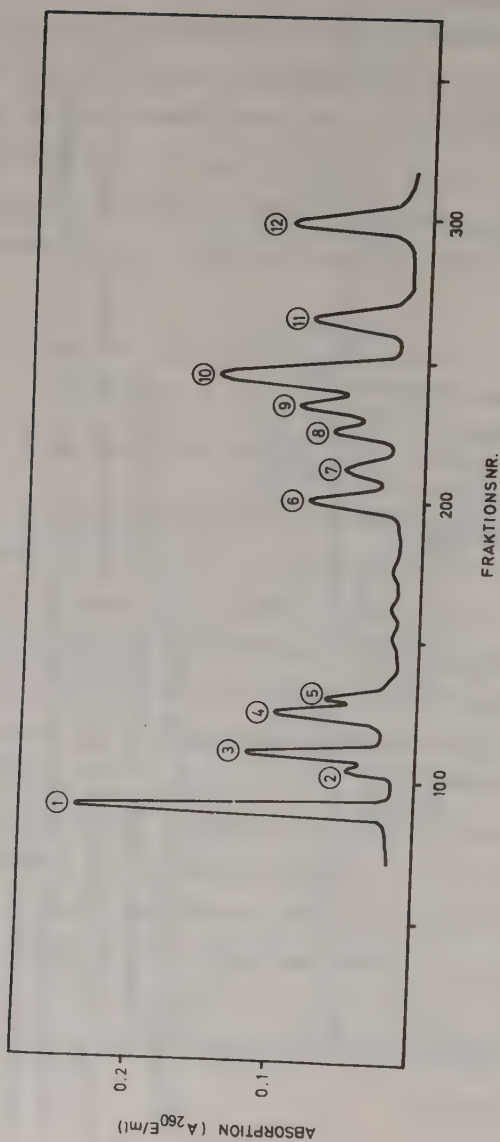


Abb. 8: Spaltung von tRNA^{Met}₂ mit RNAase T₁

Chromatografie der Spaltprodukte an DEAE Cellulose

20 A₂₆₀^E tRNA^{Met}₂ wurden, wie unter 6.1.5. beschrieben, mit RNAase T₁ gespalten, und die Oligonukleotide an einer DEAE Cellulose Säule, wie unter 6.1.1.6. angegeben, chromatografiert.

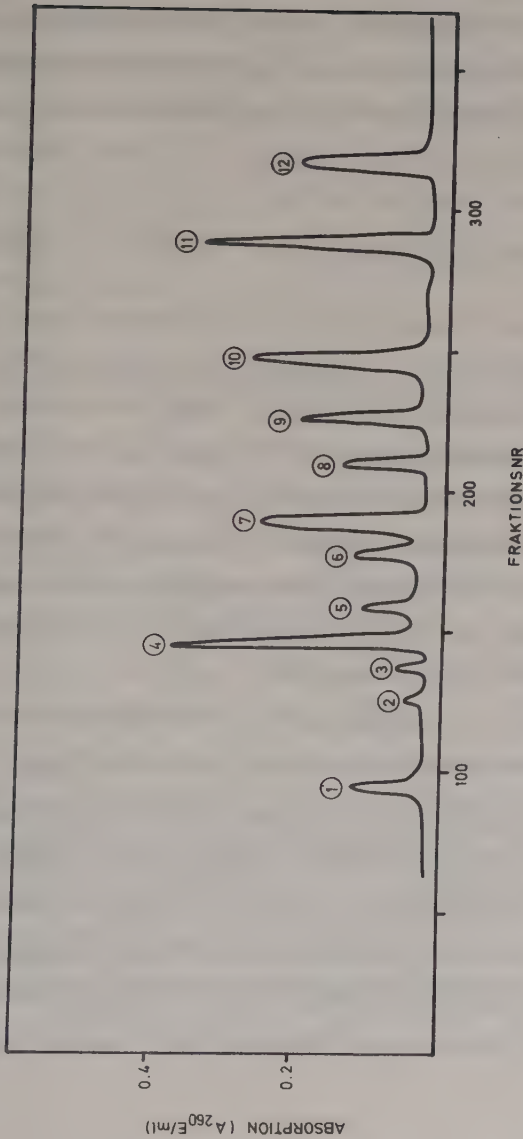


Abb. 9: Spaltung von tRNA₃^{Met} mit RNAase T₁

Chromatografie der Spaltprodukte an DEAE Cellulose

20 A₂₆₀ tRNA₃^{Met} wurden, wie unter 6.1.5. beschrieben, mit RNAase T₁ gespalten, und die Oligonukleotide an einer DEAE Cellulose Säule, wie unter 6.1.1.6. angegeben, chromatografiert.

$\text{tRNA}_2^{\text{Met}}$ mit RNAase T_1 gespalten und unter identischen Bedingungen chromatografiert. Die Spaltmuster sind in Abb. 8 und Abb. 9 wiedergegeben. Wie man sieht, sind auch diese methioninspezifischen tRNAs genügend hoch angereichert, um sequenziert werden zu können.

2.2.2. Analyse der T_1 -Spaltprodukte

Will man den Grad der Verwandtschaft verschiedener tRNAs (wie hier z.B. von Isoakzeptoren) bestimmen, dann dienen die T_1 Spaltmuster als erste Vergleichsmöglichkeit, sofern diese unter identischen Bedingungen gewonnen wurden. Je größer die Sequenzunterschiede in den verschiedenen tRNAs sind, um so mehr sollten sich ihre Oligonukleotidmuster voneinander unterscheiden. Andererseits können bereits wenige Basenaustausche zu recht unterschiedlichen Spaltmustern führen, wie dies für die beiden serinspezifischen $\text{tRNA}_1^{\text{Ser}}$ und $\text{tRNA}_2^{\text{Ser}}$ gezeigt wurde (21).

Eine weitere Analyse der Oligonukleotide ist daher unbedingt erforderlich, will man nicht zu falschen Schlüssen gelangen.

Die nach dem Absorptionsprofil der DEAE Cellulose Säule vereinigten Oligonukleotidfraktionen wurden, wie unter 6.1.6 beschrieben, isoliert und der Papierelektrophorese (s. 6.1.10) unterworfen. Hierbei trennen sich die T_1 -Spaltprodukte, welche zusammen von der DEAE Cellulose Säule eluieren. Von allen Oligonukleotiden wurden UV-Spektren von 220 bis 300 nm bei pH 7 und pH 2 aufgenom-

men. Danach konnten die einfacheren Oligonukleotide in ihrer Zusammensetzung bestimmt werden. Im allgemeinen war jedoch eine Nachspaltung mit RNAase A (s. 6.1.7.1.) und PME/SPDE (s. 6.1.7.2.) notwendig. Die nach RNAase A Spaltung gewonnenen Oligonukleotide wurden durch Papier- (s. 6.1.10.) oder Dünnschichtelektrophorese (s. 6.1.9.), die nach PME/SPDE Spaltung erhaltenen Nukleoside durch Dünnschichtchromatografie in System a und b (s. 6.1.8) getrennt.

2.3. Bestimmung des Dihydrouridingehaltes in $\text{tRNA}_1^{\text{Met}}$ und $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$

Die von Batt et al. (110) übernommene Methode beruht auf der Tatsache, daß das Nukleosid D in alkalischer Lösung ein Absorptionsmaximum bei 235 nm besitzt, welches jedoch rasch verschwindet, da im Alkalischen der Ring des Dihydrouridins geöffnet wird. Aus der zeitlichen Abnahme der Absorption kann man nach Extrapolation auf die Zeit Null den Gehalt an Dihydrouridin bestimmen. Die molaren Extinktionskoeffizienten sind für D: $\epsilon_D = 9.2$ (bei 235 nm) für tRNA: $\epsilon_{\text{tRNA}} = 625$ (bei 260 nm). Der Versuch wurde wie in 6.1.12. beschrieben durchgeführt. Die Konzentration eines gelösten Stoffes berechnet sich in einer photometrischen Bestimmung nach der Gleichung von Lambert-Beer zu $c = \frac{E}{\epsilon \cdot d}$. Die Schichtdicke d war in unserem Fall 1 cm. Aus der Tabelle 2 ergeben sich die Meßwerte und die Berechnung des Dihydrouridin Gehaltes.

Tabelle 2: Bestimmung des Dihydrouridingehaltes in tRNA^{Met}_{1,3}

		E	ϵ	c (mMol)	c_D/c_{tRNA}
tRNA ^{Met} ₁	D	0.047	9.2	5.06	1.8
	tRNA	1.763	625	2.8	
tRNA ^{Met} ₃	D	0.056	9.2	6.09	2.04
	tRNA	1.863	625	2.98	

2.4. Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Experimenten zur Untersuchung der Multiplizität der methioninspezifischen tRNAs in Brauereihefe

1. Mit den beschriebenen Anreicherungsverfahren können die tRNA^{Met}_{1,2,3} in einer für die Sequenzierung ausreichenden Menge und mit einem Reinheitsgrad von ca. 90 % erhalten werden.
2. Die drei methioninspezifischen tRNAs haben unterschiedliche Primärstrukturen, denn sie zeigen außer einem unterschiedlichen T₁-Spaltmuster auch unterschiedliche Basenzusammensetzungen in den großen Oligonukleotiden. Ihre Strukturen sind daher weder als Artefakte bei der Aufarbeitung entstanden, noch sind sie Aggregate der einen oder anderen tRNA^{Met} Spezies.
3. In tRNA^{Met}₁ wurde kein -Tp ψ pCpGp- gefunden, eine Nukleotidfolge, die bis dahin als ein fester Bestandteil in allen tRNAs

angesehen wurde. Wie sich später herausstellte (111), ist diese Basenfolge durch -ApUpCpGp- ersetzt.

4. Im Unterschied zu $\text{tRNA}_1^{\text{Met}}$ enthält $\text{tRNA}_2^{\text{Met}}$ die Nukleotidsequenz Tp ψ pCpGp.
5. In $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ konnte eine Reihe von Oligonukleotiden sicher identifiziert werden, für andere wurden bestimmte Strukturen wahrscheinlich gemacht. Die Zahlen in der folgenden Aufstellung beziehen sich auf die Absorptionsgipfel des Chromatogramms (Abb. 9).
 - (1) Gp
 - (2) CpGp
 - (3) UpGp, ist wegen der geringen Menge als Verunreinigung anzusehen
 - (4) ApGp
 - (5) 3'-Ende, vermutlich CpApCpCpA_{OH}
 - (6) enthält die beiden Oligonukleotide UpApGp und DpApGp
 - (7) enthält drei Oligonukleotide. ApApGp konnte sicher nachgewiesen werden. Vermutlich sind die anderen beiden das 5'-Ende pGp und die Extraschleife (III).
 - (8) Tp ψ pCpGp
 - (9) und (10) sind sich sehr ähnlich, sie enthalten beide ApGp, und Cp und Up etwa im gleichen Verhältnis. Aus ihrer Position im Elutionsprofil der DEAE-Cellulose Säule muß es sich um Penta- oder Hexanukleotide handeln.
 - (11) und (12) haben sehr komplexe Sequenzen, die hier nicht

eingehender untersucht wurden.

6. $\text{tRNA}_1^{\text{Met}}$ und $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ enthalten beide je zwei Mol Dihydrouridin pro Mol tRNA. Diese Ergebnisse wurden durch die Sequenzuntersuchungen an $\text{tRNA}_1^{\text{Met}}$ (111) und an $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ in dieser Arbeit (Kap. 3) bestätigt.

3. Ermittlung der Primärstruktur von $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ aus Brauereihefe

3.1. Reinigung von ^{32}P -markierter $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$

Im vorigen Kapitel wurden die Reindarstellung und erste Untersuchungen zur Bestimmung der Primärstruktur von $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ beschrieben. Die Experimente zur Bestimmung der Nukleotidsequenz wurden nach den von Holley et al. (111) entwickelten Methoden durchgeführt. Einen neuen Weg zur Sequenzierung von radioaktiv markierter RNA zeigten Sanger et al. (112, 113) auf. Die wesentlichen Vorteile dieser Methode liegen zum einen darin, daß nur sehr geringe Mengen an RNA benötigt werden, zum anderen, daß die Auftrennung der Produkte bestimmter enzymatischer Spaltungen nach der Methode von Holley ziemlich umständlich erfolgt, während sie nach der Methode von Sanger in einfacher Weise durchgeführt werden kann. Deshalb bot sich diese Methode auch zur Bestimmung der Primärstruktur von $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ an.

Radioaktiv markierte tRNA wurde aus einer Hefekultur gewonnen, die mit ^{32}P -Phosphat angezogen worden war (s. 6.2.1.). $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ wurde anfangs nach dem im Abschnitt 2.1. beschriebenen Verfahren gereinigt. Dieses Verfahren ist im Prinzip auch für ^{32}P -markierte tRNA anwendbar, doch stellten sich wesentliche Mängel heraus: 1.) Die kurze Halbwertszeit des Isotops ^{32}P von nur 14 Tagen erfordert ein überaus schnelles Arbeiten. Die erarbeitete Methode zur Reindarstellung von $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ in vier Säulenschritten ist jedoch zeitaufwendig, was zu hohen Verlusten führt. 2.) Die Lage der

tRNA^{Met}₃ Fraktion im Elutionsprofil wurde durch Beladung der Säulenfraktionen mit ³H- oder ¹⁴C-Methionin getestet. Da nun die tRNA selbst mit ³²P hoch markiert war, mußte diskriminierend gezählt werden. Selbst bei Verwendung von ³H-Methionin mit sehr hoher spezifischer Aktivität (8000 Ci/Mol) und günstiger Einstellung des Spektrometers ist der Zählwertüberschlag vom ³²P- in den ³H-Kanal wegen der rund hundertmal höheren Strahlungsenergie des ³²P- gegenüber dem ³H-Isotops sehr hoch. Dadurch wurde die Bestimmung der tRNA^{Met}₃ Fraktion in den Säulenprofilen durch Beladungstest zu ungenau, was zu einer Verminderung des Reinheitsgrades der tRNA^{Met}₃ führte. Es wurde deshalb nach einer neuen Anreicherungsverfahren gesucht, die die aufgezeigten Mängel umgeht. Insbesondere mußte die neu zu erarbeitende Methode zwei Bedingungen erfüllen: (1.) Die Zahl der Säulenschritte sollte gering sein (2.) Die Lage der tRNA^{Met}₃ Fraktion sollte aus dem Absorptionsprofil der einzelnen Säulen so eindeutig erkannt werden, daß auf einen Beladungstest verzichtet werden kann.

3.1.1. Vorversuche zur Reinigung der tRNA^{Met}

3.1.1.1. Auftrennung der tRNAs nach Tener

Die folgenden Versuche wurden zunächst mit käuflicher nichtradioaktiver tRNA (Boehringer) durchgeführt.

Als erstes wurde ein von Tener et al. (114) beschriebenes Verfahren angewandt. Das unfractionierte tRNA Gemisch wurde mit Methio-

nin beladen und anschließend mit dem Naphtoxyacetyl- bzw. Phenoxyacetylesther von N-Hydroxysuccinimid umgesetzt. Durch diese Derivatisierungsprozedur wurden die tRNAs^{Met} mit einem aromatischen Substituenten versehen, wodurch ihr chromatografisches Verhalten an BD-Cellulose grundlegend geändert wird: Während alle unbeladenen und damit nicht derivatisierten tRNAs mit einem Salzgradienten von der Säule eluieren, benötigen die substituierten Aminoacyl-tRNAs zusätzlich 10 % Alkohol im Elutionspuffer.

Die substituierte Aminoacylgruppe kann im Alkalischen wieder abgespalten werden. Man erhält so die methioninspezifischen tRNAs getrennt von allen übrigen tRNAs. Anschließende Chromatografie an BD-Cellulose pH 4.5 sollte die reinen, voneinander getrennten tRNAs^{Met} ergeben.

Das Verfahren nach Tener läßt sich grundsätzlich auch für die methioninspezifischen tRNAs aus Hefe anwenden. Abb. 10 zeigt das Chromatogramm einer BD-Cellulose Säule, die nach dieser Methode entwickelt wurde. Jedoch wurden immer nur sehr geringe Ausbeuten an tRNAs^{Met} erzielt. Ein Grund für den geringen Erfolg mit dieser Methode ist in der besonderen Instabilität der Esterbindung von Methionyl-tRNA zu suchen. Dadurch verläuft die Derivatisierung - der entscheidende Schritt dieses Verfahrens - nur unvollständig.

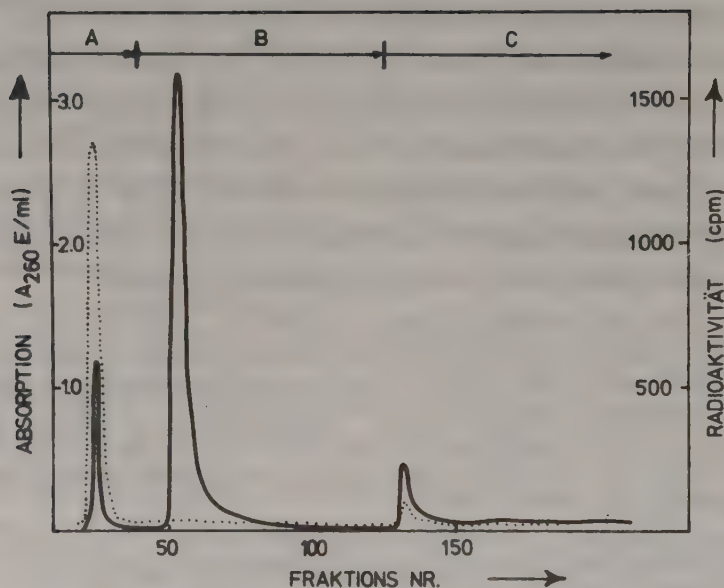


Abb. 10: Auftrennung der tRNAs nach Tener

50 A₂₆₀^E tRNA (Boehringer) wurden mit ¹⁴C-Methionin beladen und nach der Vorschrift von Gillam et al. (106) mit dem 2-Naphtoxy-acetyylester des N-Hydroxysuccinimids umgesetzt. Die Chromatografie der derivatisierten tRNA erfolgte an einer BD-Cellulose Säule 1 x 40 cm. Es wurde mit drei verschiedenen Puffern, wie in Abb. 10 angegeben, eluiert. Die Puffer enthielten alle 0.01 M MgCl₂, 0.01 M Na-Azetat pH 4.5. Zusätzlich war in Puffer A 0.3 M NaCl, in Puffer B 1 M NaCl und in Puffer C 1 M NaCl + 10 % Äthanol enthalten. Das Fraktionsvolumen war 4 ml, die Flußgeschwindigkeit 6 min. pro Fraktion.

—: Absorption bei 260 nm,: ¹⁴C-Radioaktivität

3.1.1.2. Analytische Säulenchromatografien an BD-Cellulose pH 3.0 und pH 5.0

Ein besserer Weg bot sich in der Verwendung von BD-Cellulose Säulen pH 3.0 (115) an. Dieser Säulentyp trennt die methioninspezifischen tRNAs zusammen vor der Hauptmenge der übrigen tRNAs weitgehend ab. Anschließende Auftrennung der drei Hauptspezies an einer BD-Cellulose Säule pH 5.0 sollte wiederum die nahezu reinen tRNAs^{Met} liefern.

75 A₂₆₀^E tRNA (Boehringer) wurden zusammen mit 25 A₂₆₀^E mit ¹⁴C-Methionin beladener tRNA (Boehringer) (ca. 50 000 cpm) auf eine BD-Cellulose Säule pH 3.0 aufgetragen und wie in 6.2.2.2. beschrieben eluiert. Die Radioaktivität in den Säulenfraktionen wurde bestimmt. Hierbei zeigte sich, daß nahezu die gesamte Radioaktivität in der ersten Steigung und somit an einer leicht zu identifizierenden Stelle des Absorptionsprofils zu finden war (Abb. 11 a). Die Fraktionen 147-157 wurden vereinigt und Material aus mehreren Säulenläufen gesammelt. Insgesamt 35 A₂₆₀^E wurden nun an einer BD-Cellulose Säule pH 5.0 (s. 6.2.2.3.) chromatografiert. Diese Säule trennt die drei methioninspezifischen tRNAs in einheitliche Spezies auf (Abb. 11 b).

Zu Abb. 11

Abb. 11 a: Chromatografie von tRNA aus Brauereihefe an BD-Cellulose pH 3.0

25 A₂₆₀^E mit ¹⁴C-Methionin beladene und 75 A₂₆₀^E unbeladene tRNA

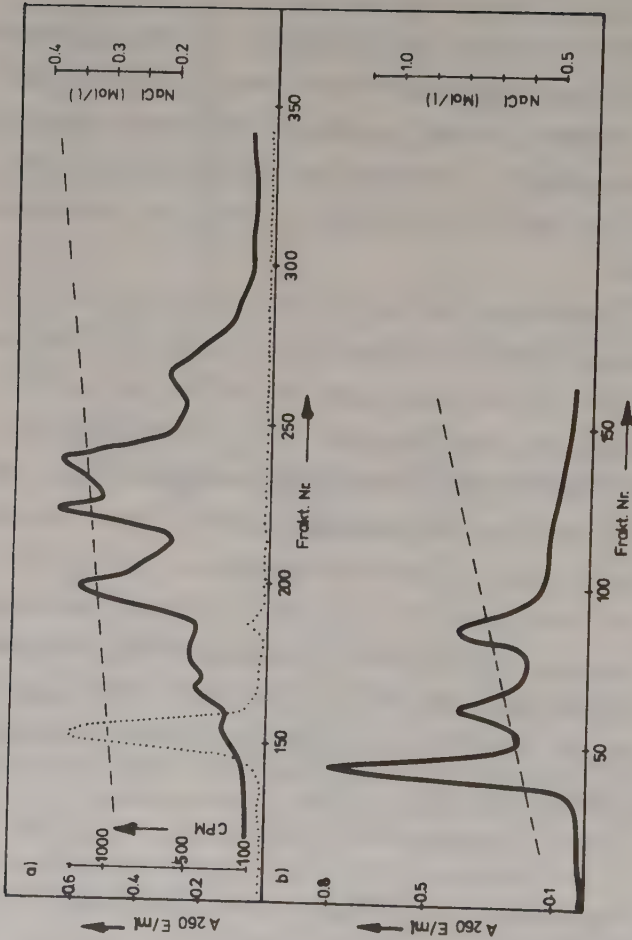


Abb. 11: Analytische Säulenchromatografien an BD-Cellulose pH 3.0 und pH 5.0 zur Reinigung der methioninspezifischen tRNAs aus Brauereihefe

(Boehringer) wurden zusammen an einer BD-Cellulose Säule pH 3.0, wie unter 6.2.2.2. beschrieben, chromatografiert.

Abb. 11 b: Chromatografie der tRNA^{Met} Fraktionen aus der BD-Cellulose Säule pH 3.0 (Abb. 11 a) an BD-Cellulose pH 5.0 35 A₂₆₀^E tRNA (Frakt. 147-157 in Abb. 11 a) wurden an einer BD-Cellulose Säule pH 5.0, wie unter 6.2.2.3. angegeben, chromatografiert.

————: Absorption bei 260 nm,: ¹⁴C-Radioaktivität,
- - - -: Verlauf des Salzgradienten

3.1.1.3. Beladung der gereinigten tRNA^{Met} Fraktionen mit ¹⁴C-Methionin

Es mußte noch gezeigt werden, daß die Absorptionsgipfel im Elutionsprofil der BD-Cellulose Säule pH 5.0 auch tatsächlich die drei tRNA^{Met} Spezies darstellen. Aus diesem Grund wurden die Fraktionen isoliert und mit ¹⁴C-Methionin beladen. Es ergaben sich folgende Werte:

Für tRNA ₁ ^{Met}	891 pMol/A ₂₆₀ ^E
tRNA ₂ ^{Met}	825 "
tRNA ₃ ^{Met}	881 "

Wie man sieht, zeigen auch die nach dieser Methode gereinigten tRNAs keine volle Beladbarkeit (vgl. Kap. 2.1.2.). Doch wird deutlich, daß die drei Absorptionsgipfel der BD-Cellulose Säule pH 5.0 den drei methioninspezifischen tRNA Hauptspezies entsprechen.

3.1.1.4. Bestimmung der Position der unbeladenen tRNA^{Met} im Elutionsprofil der BD-Cellulose Säule pH 3.0

Bisher war nur die Lage der beladenen methioninspezifischen tRNA^{Met} im Absorptionsprofil der BD-Cellulose Säule pH 3.0 bestimmt worden. Die Auftrennung von ³²P-tRNA sollte aber in unbeladener Form erfolgen. Deshalb mußte noch die Frage geklärt werden: Gibt es Unterschiede zwischen beladenen und unbeladenen tRNA^{Met} in ihrem chromatografischen Verhalten an BD-Cellulose pH 3.0, wenn ja, wo eluieren unbeladene tRNA^{Met}?

Hierzu wurde folgender Versuch unternommen: An einer BD-Cellulose Säule pH 3.0 (s. 6.2.2.4.) wurden 10 000 A₂₆₀^E tRNA (Boehringer) und 50 A₂₆₀^E mit ¹⁴C-Methionin beladene tRNA (Boehringer) (ca. 100 000 cpm) chromatografiert (Abb. 12). Im Anschluß daran wurden zwei Bestimmungen durchgeführt: Zum einen wurde die Radioaktivität in den Säulenfraktionen gemessen. Dies ergab die Lage der beladenen tRNA^{Met}. Zum anderen wurde die tRNA in den Fraktionen isoliert (s. 6.2.2.4.) und die Akzeptoraktivität für Methionin (s. 6.1.3.) ermittelt. Danach wurde die Position der unbeladenen tRNA^{Met} im Chromatogramm bestimmt. In Abb. 12 sind die Kurven für die beladenen und unbeladenen tRNA^{Met} eingetragen. Wie man erkennt, fallen sie zusammen, d.h. die Position der beladenen tRNA^{Met} im Elutionsprofil der BD-Cellulose Säule pH 3.0 ist zugleich die Position der unbeladenen tRNA^{Met}.

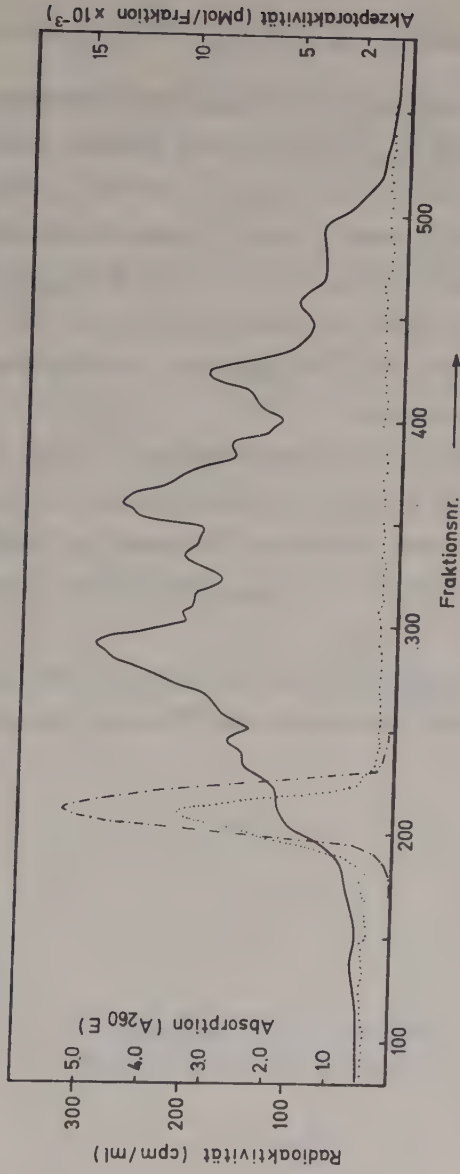


Abb. 12: Bestimmung der Position der unbeladenen tRNA_{Met} im Elutionsprofil der BD-Cellulose Säule pH 3.0
 10 000 $\text{A}_{260\text{E}}$ tRNA (Boehringer) und 50 $\text{A}_{260\text{E}}$ mit ^{14}C -Methionin beladene tRNA (Boehringer) (ca. 100 000 cpm) wurden zusammen an einer BD-Cellulose Säule pH 3.0 chromatografiert (s. 6.2.2.4.). Die Akzeptoraktivität für Methionin in den Säulenfraktionen wurde bestimmt.

—: Absorption bei 260 nm,: Akzeptoraktivität für Methionin,
 -.-.-.-: ^{14}C -Radioaktivität

3.1.2. Präparative Säulenchromatografien von ^{32}P -markierter tRNA

^{32}P markierte tRNA wurde wie in 6.2.1. beschrieben hergestellt, die Ausbeute betrug ca. 400 A₂₆₀E. Dieses tRNA Gemisch wurde an einer BD-Cellulose Säule pH 3.0 (s. 6.2.2.5.) chromatografiert (Abb. 13). Die durch eine Klammer in Abb. 13 gekennzeichneten tRNA^{Met} Fraktionen wurden vereinigt und an einer BD-Cellulose Säule pH 5.0 (s. 6.2.2.3.) getrennt (Abb. 14). Wie aus Abb. 14 zu ersehen ist, erhält man drei Absorptionsgipfel, entsprechend den drei methioninspezifischen tRNAs.

Damit war gezeigt, daß die neue Trennmethode für ^{32}P -tRNA anwendbar ist. Das Verfahren ist schnell, denn es benötigt nur zwei Säulenschritte. Auf Grund der eindeutigen Position der tRNA^{Met} Fraktion im Säulenprofil der BD-Cellulose Säule pH 3.0 entfällt zudem der Beladungstest.

RNAase T₁ Spaltmuster, wie sie im folgenden Kapitel beschrieben werden, ergaben, daß die so gewonnenen tRNA^{Met} zu ca. 80-90 % rein waren.

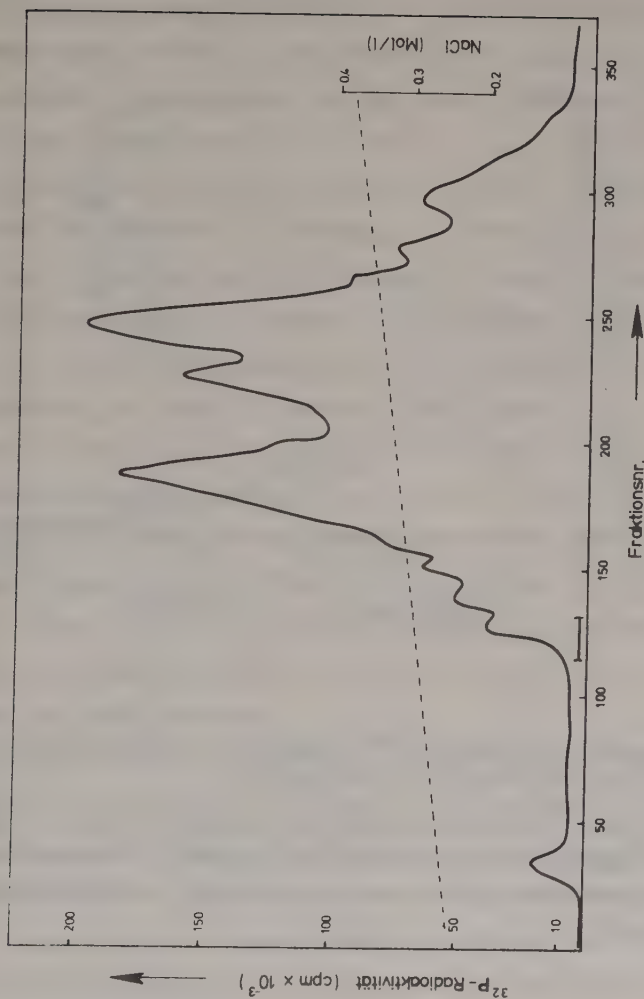


Abb. 13: Chromatografie von ^{32}P -tRNA an BD-Cellulose Säule pH 3.0
 $400 \text{ A}_{260} \text{ E } ^{32}\text{P}$ -tRNA ($1.5 \times 10^{10} \text{ cpm}$) wurden an einer BD-Cellulose Säule, wie unter 6.2.2.5.
 beschrieben, chromatografiert.

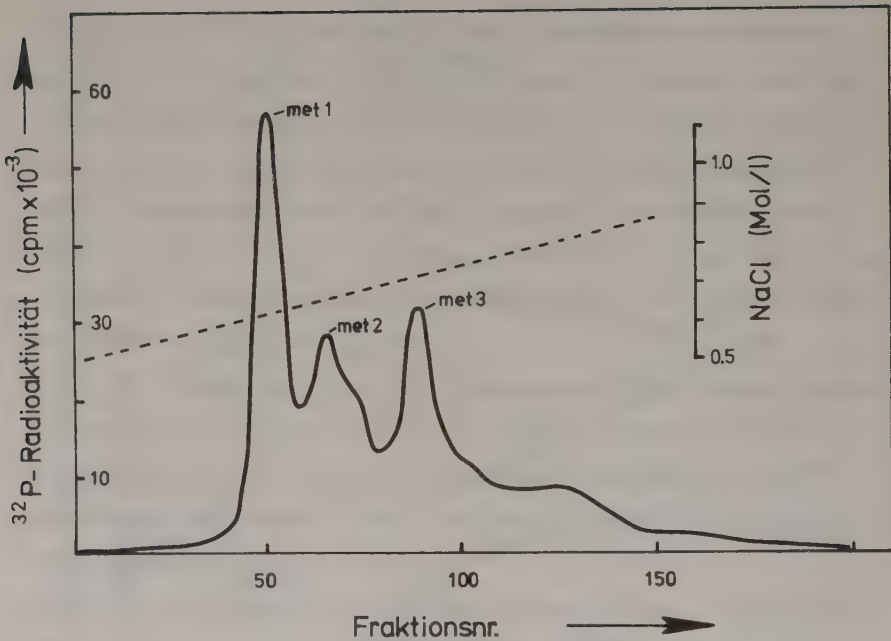


Abb. 14: Chromatografie der tRNA^{Met} Fraktion aus der BD-Cellulose Säule pH 3.0 an BD-Cellulose pH 5.0

1.2×10^8 cpm tRNA^{Met} Fraktion aus der BD-Cellulose Säule pH 3.0 (durch Klammer gekennzeichnete Fraktionen in Abb. 13) wurden an einer BD-Cellulose Säule pH 5.0, wie unter 6.2.2.3. beschrieben, chromatografiert.

3.2. Bestimmung der Nukleotidsequenz von tRNA^{Met}₃

Methodische Grundlage für die in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente waren die von Sanger et al. (112) entwickelten Techniken der Sequenzierung von radioaktiv markierter RNA. In der Methodik folgen Sanger et al. den von Holley et al. (2) entwickelten Verfahren zur Sequenzierung von tRNAs. Durch Spaltung der tRNA mit spezifischen Enzymen, wie RNAase T₁ und RNAase A werden Oligonukleotide erhalten, die sich auftrennen lassen und deren Sequenzen dann durch weitere Spaltungen mit verschiedenen Enzymen oder Alkali bestimmt werden. Anschließend werden durch Partialspaltung der tRNA mit RNAase T₁ oder RNAase A größere Fragmente produziert. Diese können durch vollständige Spaltung mit dem zuvor verwendeten Enzym in die, in ihrer Sequenz bereits bekannten, Oligonukleotide zerlegt werden. Durch Vergleich der in den größeren Fragmenten enthaltenen Oligonukleotide werden Überlappungen sichtbar, die schließlich die Anordnung der Oligonukleotide in der richtigen Reihenfolge ermöglicht. Damit ist die Primärstruktur der tRNA bestimmt.

Die qualitative und quantitative Bestimmung von radioaktiv markierten Nukleotiden oder Oligonukleotiden durch Radioautografie ist eine empfindlichere Methode als die photometrische Messung. Deshalb ist es möglich, bei Verwendung radioaktiv markierter tRNA in wesentlich kleinerem Maßstab zu arbeiten und andere Trennmethoden anzuwenden, die es gestatten, mehrere Bestimmungen gleichzeitig durchzuführen.

3.2.1. Kurze Beschreibung der Techniken nach Sanger et al.

Alle Spaltungen werden in ausgezogenen Glaskapillaren durchgeführt in einem Volumen, das 10 μ l selten übersteigt. Nach der Inkubation werden die Proben zur Auftrennung der Spaltprodukte direkt auf das Trennmedium (Papier, Dünnschichtplatte, Gel) aufgetragen, Säulen werden nicht verwendet. Spaltungen von ganzer tRNA mit RNAase T₁ und RNAase A werden durch zweidimensionale Papierelektrophorese ("fingerprint") getrennt. Die Elution der Produkte erfolgt direkt in Kapillaren, von DEAE-Cellulose Papier mit 30 % Triäthylammoniumcarbonat pH 9.0, von allen anderen Papieren mit H₂O. Das Eluat (ca. 200 μ l) wird eingetrocknet und ist damit fertig für eine Weiterverarbeitung.

Partialsplattungen von tRNA mit RNAase T₁ oder RNAase A werden im allgemeinen durch Homochromatografie getrennt. Dies ist ein Verfahren, das Papierelektrophorese in der einen Richtung mit Papierchromatografie in der zweiten Richtung verbindet. Als Laufmittel für die Chromatografie wird eine Lösung von teilweise angedauter hochmolekularer RNA verwendet. Eine zweidimensionale Gelelektrophorese, wie sie von uns entwickelt wurde, kann - wie in dieser Arbeit gezeigt wird - ebenfalls zur Auftrennung von Partialsplattprodukten herangezogen werden.

3.2.2. Enzymatische Spaltungen von ^{32}P -tRNA₃^{Met}

Zunächst wurde die tRNA₃^{Met} mit RNAase T₁ (s. 6.2.3.1.1.) bzw. RNAase A (s. 6.2.3.1.2.) gespalten. Dies ergab nach zweidimensionaler Elektrophorese Oligonukleotidmuster ("fingerprints"), die in Abb. 15 und 16 wiedergegeben sind. Die molaren Ausbeuten (ermittelt durch Messung der Radioaktivität) der einzelnen Oligonukleotide sind in Tabelle 3 und 4 angegeben.

Die Sequenz dieser RNAase T₁ oder RNAase A Oligonukleotide mußte durch weitere Spaltungen bestimmt werden. Nach Eluieren vom Papier der "fingerprints", wurden sie mit einem der nachstehenden Enzyme gespalten: RNAase A (Abb. 17) bzw. T₁ (Abb. 18), RNAase U₂ (Abb. 19), VPDE (Abb. 21), SPDE (Abb. 22), RNAase T₂ (Abb. 24), RNAase A nach CMCT Block (Abb. 20). Für einige Oligonukleotide war zur Bestimmung der Sequenz eine einmalige Spaltung ausreichend, für andere waren Nachspaltungen mit mehreren Enzymen notwendig. Die Produkte aus diesen Spaltungen wurden durch Papierelektrophorese oder Dünnschichtchromatografie getrennt. Spaltbedingungen und Trennmethoden sind im Methodenteil (s. 6.2.3.2.) beschrieben.

Zur Bestimmung der vollständigen Nukleotidsequenz einiger Oligonukleotide war die Ermittlung des 5'-Endes unerlässlich (Abb. 25). Diese Bestimmung gelingt durch einen Vergleich der Spaltmuster eines Oligonukleotids nach RNAase T₂- und VPDE Spaltung. Da die Spaltung mit VPDE 5' Mononukleotide ergibt, fehlt in diesem Spalt-

Tabelle 3: Oligonukleotide nach Spaltung von tRNA₃^{Met} mit RNAase T₁.

		molare Ausbeute	
		gefunden	tatsächlich vorhanden
T 1	Gp	3.1	2
T 2	ApGp	4.9	4
T 3	ApApGp	1.7	2
T 4	CpApCpCpA _{OH}	0.7	1
T 5	pGp	1.0	1
T 6	UpApm ² Gp	0.9	1
T 7	DpApGp	1.1	1
T 8a	m ⁷ GpDpm ⁵ CpGp	0.6	1
T 8b	m ⁷ GpUpm ⁵ CpGp	0.2	
T 9	CpUpCpApGp	0.9	1
T 10	Cpm ² GpψpCpApGp	0.8	1
T 11	TpψpCpGp	1.3	1
T 12	CpUpUpCpApGp	1.0	1
T 13	m ¹ ApApCpCpUpCpUpCpCpUpGp	0.9	1
T 14	ψpCpUpCpApUpt ⁶ ApApψpCpUpGp	1.1	1

In wechselnden Mengen wurden in verschiedenen tRNA₃^{Met} Präparationen CpGp und ψpCpApGp gefunden. Diese zusätzlichen Spaltprodukte entstehen bei unvollständig modifiziertem T 10.

Tabelle 4: Oligonukleotide nach Spaltung von tRNA^{Met}₃ mit RNAase A.

		molare Ausbeute	
		gefunden	tatsächlich vorhanden
P 1	Up	5.9	8
P 2	Ψp	0.9	1
P 3	Cp und m ⁵ Cp	7.5	11
P 4	ApCp	1.2	1
P 5	ApUp	0.8	1
P 6	Ap ^m ₂ GpCp	0.9	1
P 7	Gp ^m ₁ ApApCp	1.0	1
P 8a	m ² ₂ GpΨp	1.0	1
P 8b	GpUp		
P 9	pGpCp	1.0	1
P 10	ApGpUp	3.3	3
	ApGpΨp		
	ApGpDp		
P 11	t ⁶ ApApΨp	0.9	1
P 12	GpGpApGpCp	1.2	1
P 13	GpApApGp ^m ₇ GpDp	0.9	1
P 14	GpApGpApGpTp	1.0	1
P 15	ApGpGpApApGpApGpCp	0.9	1

muster das 5'-terminale Nukleotid, da es als Nukleosid entlassen wird. Die Methode wird in 6.2.3.2.1.7. beschrieben.

3.2.3. Ermittlung der Nukleotidsequenzen der T_1 -Oligonukleotide

Tabelle 5 gibt die Ableitung der Sequenz der T_1 -Oligonukleotide schematisch wieder. In dieser Tabelle sind - mit Ausnahme von T 5 - aus Platzmangel die Nukleotide ohne Phosphat (p) geschrieben, z.B. G statt Gp! Die Bestimmung der seltenen Nukleotide erfolgte gleichzeitig mit der Bestimmung der Sequenz der Oligonukleotide, sie wird im Abschnitt 3.2.7. beschrieben.

T 1, T 2, T 3, T 5: Diese Oligonukleotide waren bereits nach Alkalispaltung hinreichend charakterisiert.

T 4: Nach RNAase A Spaltung wurden 2 Cp und ApCp erhalten. Spaltung mit RNAase U_2 lieferte CpAp und Cp, während partielle Spaltung mit SPDE als erstes Abbauprodukt ApCpCp ergab. Es handelt sich somit um das 3'-Ende mit der Sequenz
 $CpApCpCpA_{OH}$

T 6: ergab nach RNAase A Spaltung Up und Apm^2G , während

T 7 durch die gleiche Spaltung Dp und ApGp ergab, wodurch beide Sequenzen festgelegt waren.

T 8a und T 8b: Für beide wurde das 5'-Ende zu m^7G bestimmt. Spaltung mit RNAase A ergab für T 8a m^7GpDp , m^5Cp und Gp. Für T 8b wurde das gleiche Spaltmuster gefunden mit dem Unterschied, daß Dp durch Up ersetzt war. Hieraus leiten sich

Tabelle 5: Ermittlung der Nukleotidsequenzen der T₁-Oligonukleotide

	T ₂	5'-Ende	RNAase A	CMCT/RNAase A	U ₂	part.SPDE	part.VPDE	Ableitung
T 1	G							G
T 2	1 A 1 G		AG					AG
T 3	2 A 1 G		AAG					AAG
T 4	1 A 3 C		AC 2 C		CA C	CACCA ^{OH} ACCA ^{OH}		CACCA ^{OH}
T 5	pGp							pGp
T 6	1 U 1 A 1 m ² G		A m ² G U					U A m ² G
T 7	1 D 1 A 1 G		AG D					DAG
T 8a	1 m ⁷ G 1 U 1 m ⁵ C 1 G	m ⁷ G	m ⁷ GU m ⁵ C G					m ⁷ GU m ⁵ CG

Fortsetzung Tab. 5

	T ₂	5'-Ende	RNAase A	CMCT/RNAase A	U ₂	part.SPDE	part.VPDE	Ableitung
T 8b	1 m ⁷ G	m ⁷ G	m ⁷ GD					m ⁷ GDm ⁵ CG
	1 D		m ⁵ C					
	1 m ⁵ C		G					
	1 G							
T 9	2 C		AG	AG				CUCAG
	1 U		2 C	UC				
	1 A		1 U	C				
	1 G							
T 10	2 C	C	m ² Gψ	AG				Cm ² GψCAG
	1 m ² Gψ		AG	C			Cm ² GψCAG	
			2 C	+			Cm ² GψCA	
	1 A						Cm ² GψC	
T 11	1 G							TψCG
	1 T	T	TψC	TψC				
	1 ψ		ψ	G			TψCG	
	1 C		C				ψCG	
	1 G							

+) nicht weiter analysiertes Produkt.

T ₂	5'-Ende	RNAase A	CMCT/RNAase A	U ₂	part.SPDE	part.VPDE	Ableitung
T 12	2 C 2 U 1 A 1 G	AG 2 U 2 C	UUC AG C		CUUCAG UUCAG UCAG	CUUCA CUUC CUU	CUUCAG
T 13	5 C 3 U 1 m ¹ A 1 A 1 G	m ¹ AAC 4 C 3 U 1 G	m ⁶ AAC UC UG C kein U ₂ C!			m ¹ AACCUUC m ¹ AACCUU m ¹ AACCU m ¹ AACCU m ¹ AACCU	m ¹ AACCUUCUCCUG
T 14	3 C 2 ψ 3 U 2 A 1 t ⁶ A 1 G	AU t ⁶ AAψ 1 ψ 2 U 3 C G	UC ψC UG kein C!	ψCUCA U t ⁶ AA ψCUG			ψCUCAU t ⁶ AA ψCUG

die Sequenzen m^7GpDpm^5CpGp für T 8a und m^7GpUpm^5CpGp für T 8b ab.

- T 9: wurde durch RNAase A in 2 Cp, Up und ApGp gespalten. Partieller SPDE Abbau liefert, neben ungespaltenem $CpUpCpApGp$, $UpCpApGp$ und $CpApGp$. Somit lautet die Sequenz $CpUpCpApGp$.
- T 10 wurde durch RNAase A in 2 Cp, $m^2_2Gp\psi p$ und ApGp gespalten. Partieller VPDE Abbau lieferte neben Cpm^2_2Gp , $Cpm^2_2Gp\psi pC$ und $Cpm^2_2Gp\psi pCpA$ die vollständige Sequenz $Cpm^2_2Gp\psi pCpApG$.
- T 11 enthielt als 5'-Ende Tp. Partieller VPDE Abbau lieferte $Tp\psi$, während partielle SPDE Spaltung $\psi pCpGp$ ergab, woraus die Sequenz $Tp\psi pCpGp$ folgt.
- T 12 RNAase A spaltete das Oligonukleotid in 2 Cp, 2 Up und ApGp. Partieller SPDE Abbau bestimmte die Sequenz zu $CpUpUpCpApGp$, da hierbei die Produkte $CpApGp$, $UpCpApGp$, $UpUpCpApGp$ und ungespaltenes $CpUpUpCpApGp$ entstanden.
- T 13: Als 5'-Ende wurde m^1Ap gefunden. RNAase A Spaltung ergab $m^1ApApCp$, 4 Cp, 3 Up und Gp. Nach Blockierung mit CMCT und anschließender RNAase A Spaltung wurde $m^6ApApCp$, Cp, UpCp und UpGp gefunden, jedoch kein UpUpCp! Aus einer partiellen VPDE Spaltung wurden die Sequenzen $m^1ApApCpC$, $m^1ApApCpCpU$, $m^1ApApCpCpUpCpU$ isoliert. Somit hat T 13 die Struktur $m^1ApApCpCpUpCpUpCpCpUpGp$.
- T 14: Das 5'-Ende wurde zu ψp bestimmt. RNAase A spaltete in ApUp, $t^6ApAp p$, 3 Cp, 2 Up, ψp und Gp. Nach CMCT Block/

RNAase A Spaltung wurden UpCp, Ψ pCp, und UpGp, jedoch kein Cp!, erhalten. RNAase U₂ spaltete in Ψ pCpUpGp, Upt⁶ApAp und Ψ pCpUpCpAp. Demnach lautet die Sequenz Ψ pCpUpCpApUpt⁶ApAp Ψ pCpUpGp.

3.2.4. Ermittlung der Nukleotidsequenzen der RNAase A-Oligonukleotide

Tabelle 6 faßt die Ergebnisse der Spaltungen zusammen, die zur Ableitung der Sequenzen der RNAase A-Oligonukleotide geführt haben. Die Nukleotide sind aus Platzgründen wiederum ohne Phosphat geschrieben, mit der Ausnahme des 5'-Endes pGC.

P 1 bis P 9: Die Struktur dieser Oligonukleotide konnte bereits durch T₂- bzw. Alkalispaltung ermittelt werden.

P 10: Nachspaltung mit RNAase T₁ ergab ApGp, Up, Ψ p und Dp im Verhältnis 3:1:1:1, d.h. P 10 enthält die drei Oligonukleotide ApGpUp, ApGp Ψ p und ApGpDp.

P 11: Als 5'-Ende wurde t⁶Ap gefunden, wodurch, zusammen mit den Produkten der RNAase T₂ Spaltung, die Sequenz zu t⁶ApApCp festgelegt war.

P 12: Nachspaltung mit RNAase U₂ ergab GpGpAp und GpCp, womit schon die Sequenz zu GpGpApGpCp bestimmt war. RNAase T₁ und partieller SPDE Abbau lieferten den zusätzlichen Beweis.

Tabelle 6: Ermittlung der Nukleotidsequenzen der RNAase A-Oligonukleotide

	T ₂	5'- Ende	T ₁	U ₂	part. SPDE	abgeleitete Sequenz
P 1	U					U
P 2	ψ					ψ
P 3	C					
	m ⁵ C					
P 4	C					e, m ⁵ C AC
	A					
P 5	A					AU
	U					
P 6	C					
	A		A _C ² G			A _m ² G
	m ² G					
P 7	m ¹ A		m ¹ AAC G		G _m ¹ AAC m ¹ AAC AC	G _m ¹ AAC
	C					
	A					
	G					
P 8a x	m ² Gψ					m ² Gψ

x wird durch Alkali in m²G und ψ gespalten

Fortsetzung Tabelle 6

	T ₂	5'- Ende	T ₁	U ₂	part. SPDE	abgeleitete Sequenz
P 8b	G					GU
P 9	U pG C					pGC
P 10	3 A 3 G 1 ψ 1 D 1 U		3 AG 1 ψ 1 D 1 U			AGU AGψ AGD
P 11	A t ⁶ A t ⁶ A ψ	t ⁶ A				t ⁶ AA ψ
P 12	1 C 1 A 3 G		1 AG 2 G 1 C	GGA GC	GGAGC GAGC AGC GC	GGAGC
P 13	2 A 1 G 1 m ⁷ G 1 D		AAG m ⁷ GD G	GA A Gm ⁷ GD	GAAGm ⁷ GD AAGm ⁷ GD	GAAGm ⁷ GD

- P 13: Auch hier lieferte die Spaltung mit RNAase U_2 , zusammen mit den Werten aus der Spaltung mit RNAase T_2 die eindeutige Nukleotidfolge. RNAase T_1 und partieller SPDE Abbau bestimmten ebenso die Sequenz zu GpApApGpm⁷GpDp.
- P 14: Partieller SPDE Abbau lieferte den lückenlosen Sequenzaufbau GpApGpApGpTp, der in Übereinstimmung mit den durch RNAase T_2 - und RNAase T_1 -Spaltung gefundenen Daten steht.
- P 15: Partielle SPDE-Spaltung lieferte die Sequenzreihe ApApGpApGpCp. Da - wie man aus der Spaltung mit RNAase T_1 sieht - noch je ein ApGp und Gp unterzubringen war, wurde das 5'-Ende bestimmt. Es wurde Ap gefunden. Damit lautet die Sequenz ApGpGpApApGpApGpCp.

Zu den Abbildungen 15 - 28 :

Die folgenden Abbildungen stellen Autoradiografien von Papier- und Gelelektrophoresen, Dünnschicht- und Homochromatografien dar. Die Bedingungen für die enzymatischen Spaltungen und Trennverfahren sind im Methodenteil beschrieben. Es wird auf die betreffenden Abschnitte im Kapitel 6 verwiesen.

(B) gibt die Position des blauen Referenzfarbstoffes Xylen Cyanol an.

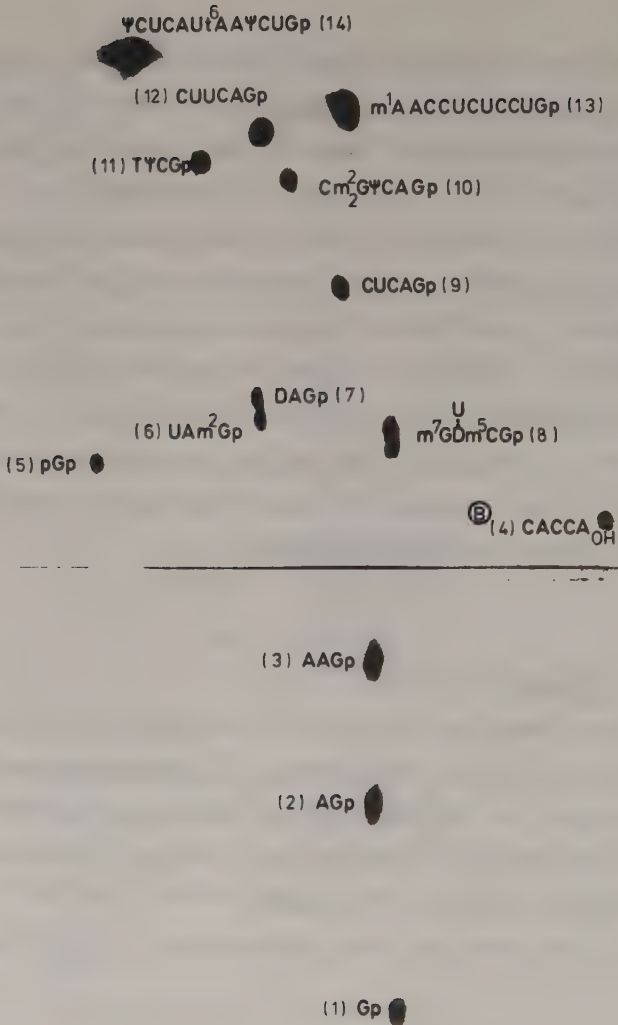


Abb. 15: Spaltung von tRNA^{Met}₃ mit RNAase T₁ (T₁-fingerprint)
 Spaltung und zweidimensionale Elektrophorese wurden, wie unter
 6.2.3.1.1. beschrieben, durchgeführt.

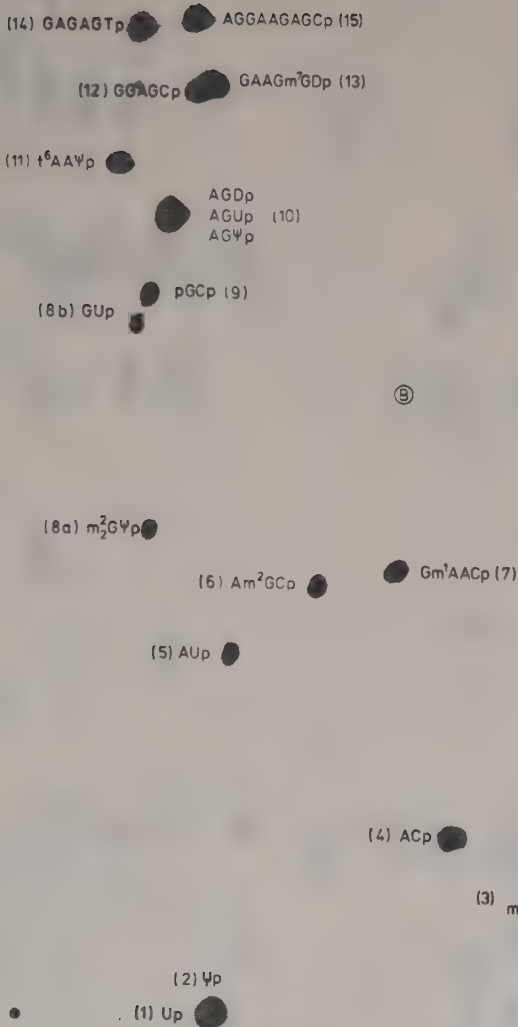


Abb. 16: Spaltung von tRNA^{Met}₃ mit RNAase A (RNAase A-finger-print)

Spaltung und zweidimensionale Elektrophorese wurden, wie unter 6.2.3.1.2. beschrieben, durchgeführt.

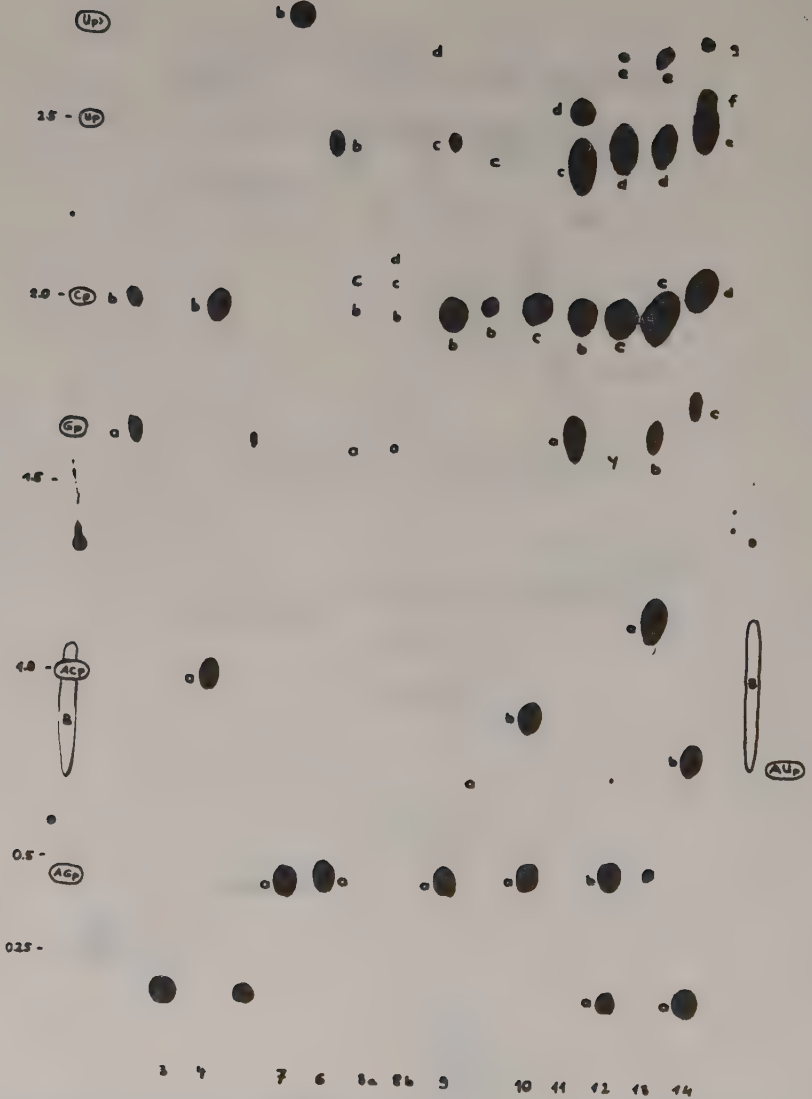


Abb. 17: Spaltung der T_1 -Oligonukleotide mit RNAase A
 Spaltung und Elektrophorese s. 6.2.3.2.1.1.

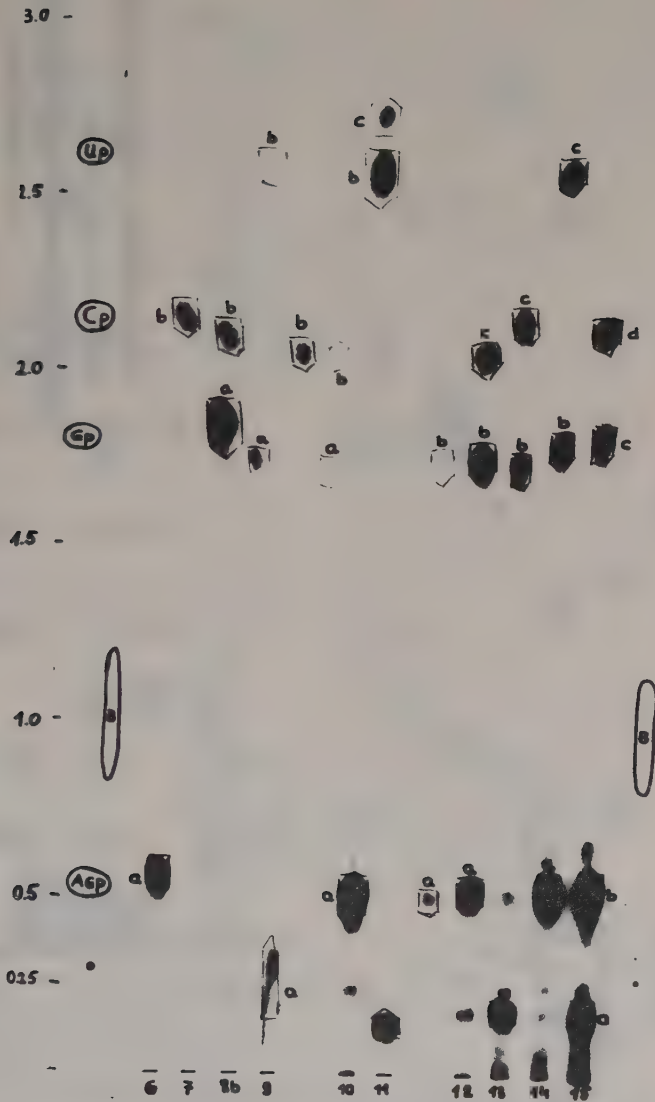


Abb. 18: Spaltung der RNAase A-Oligonukleotide mit RNAase T₁
 Spaltung und Elektrophorese s. 6.2.3.2.1.2.

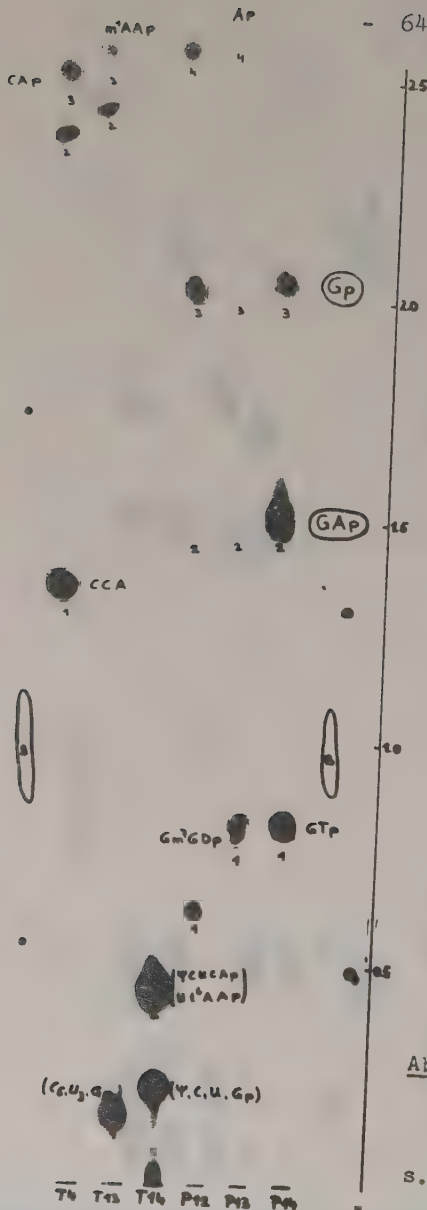


Abb. 19: Spaltung von T₁- und RNAase A-Oligonukleotiden mit RNAase U₂

Spaltung und Elektrophorese s. 6.2.3.2.1.3.

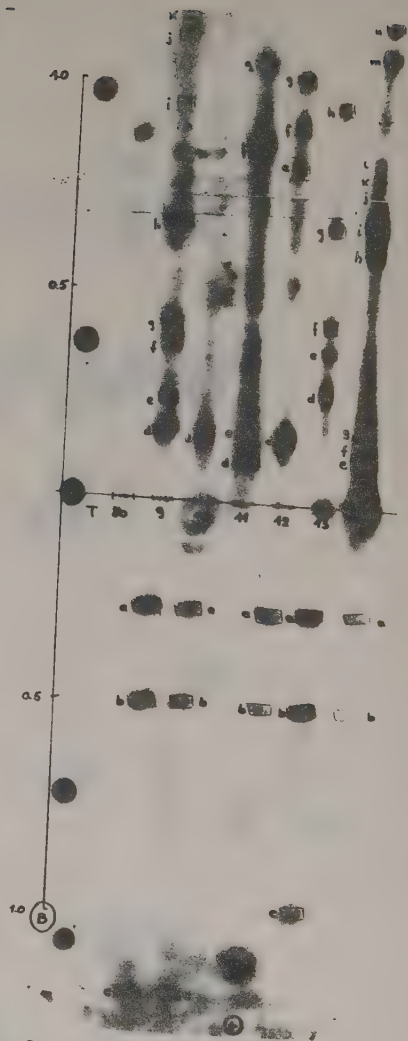


Abb. 20: Spaltung von T₁-Oligonukleotiden mit RNAase A nach CMCT Block
s. 6.2.3.2.1.6.

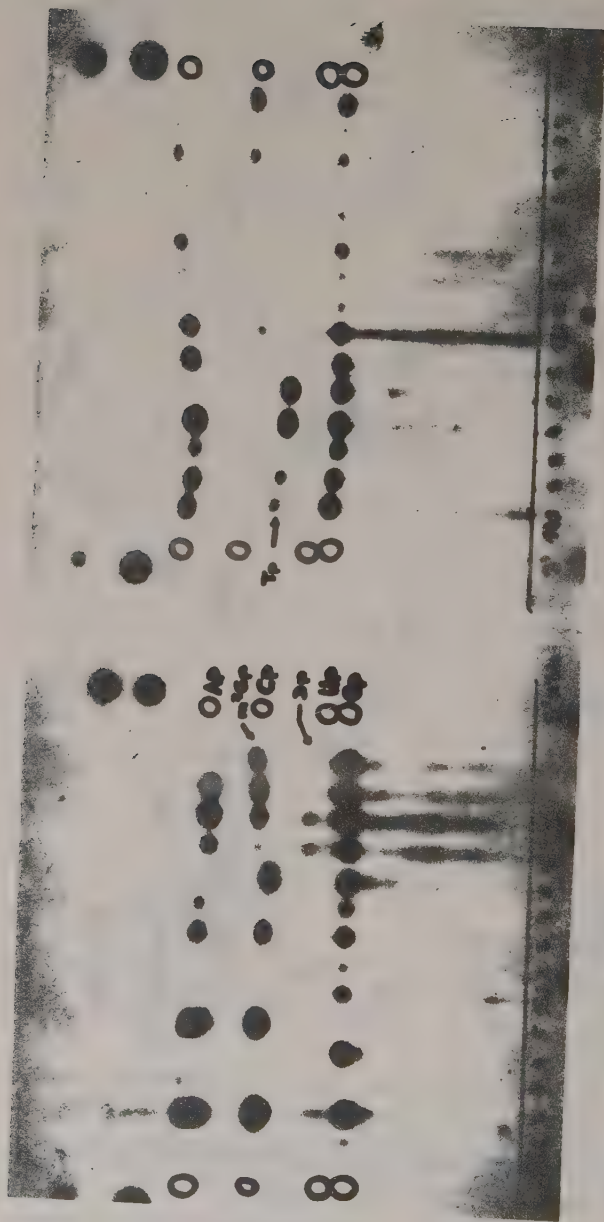


Abb. 23: Analyse der aus der partiellen Spaltung von RNAase A-Oligonukleotiden mit SPDE (Abb. 22) entstandenen Spaltprodukte.
Die aus der partiellen SPDE Spaltung entstandenen Oligonukleotide wurden mit RNAase T₂

(s. 6.2.3.2.1.4.) nachgespalten und die erhaltenen Mononukleotide durch Dünnschichtchromatografie im System c (s. 6.1.8.) identifiziert. Dadurch konnten alle in Abb. 22 gezeigten Partialsplattprodukte in ihrer Nukleotidsequenz aufgeklärt werden.

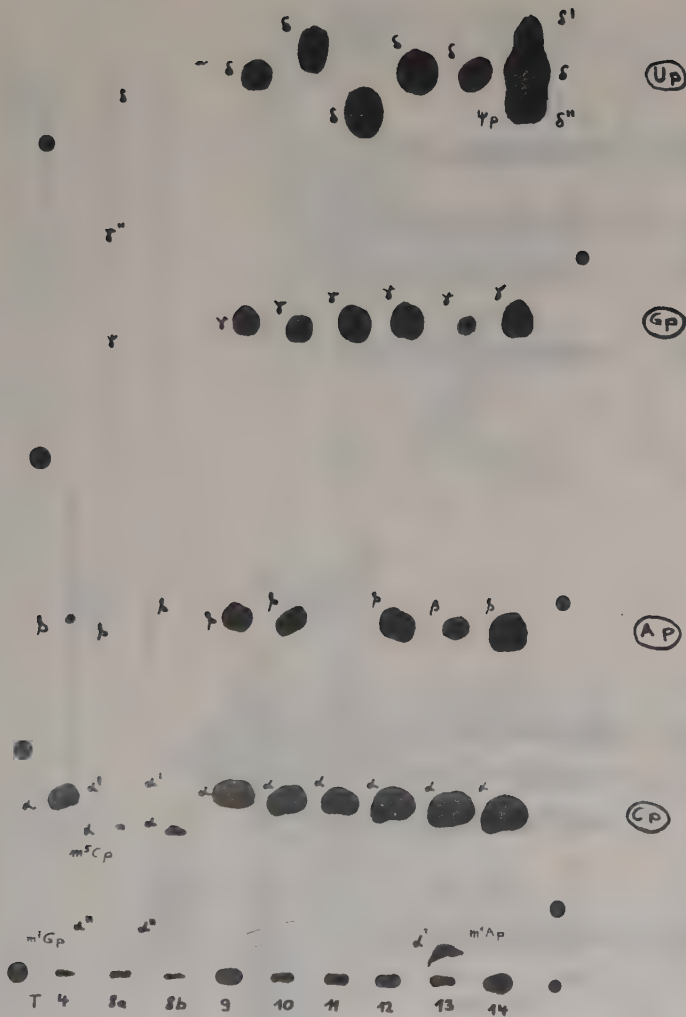


Abb. 24: Spaltung von T_1 -Oligonukleotiden mit RNAase T_2

Spaltung und Elektrophorese wurden, wie unter 6.2.3.1.4. beschrieben, durchgeführt. Die entstandenen Mononukleotide wurden auf Dünnschichtplatten chromatografiert, und dienten der Identifizierung der seltenen Basen.

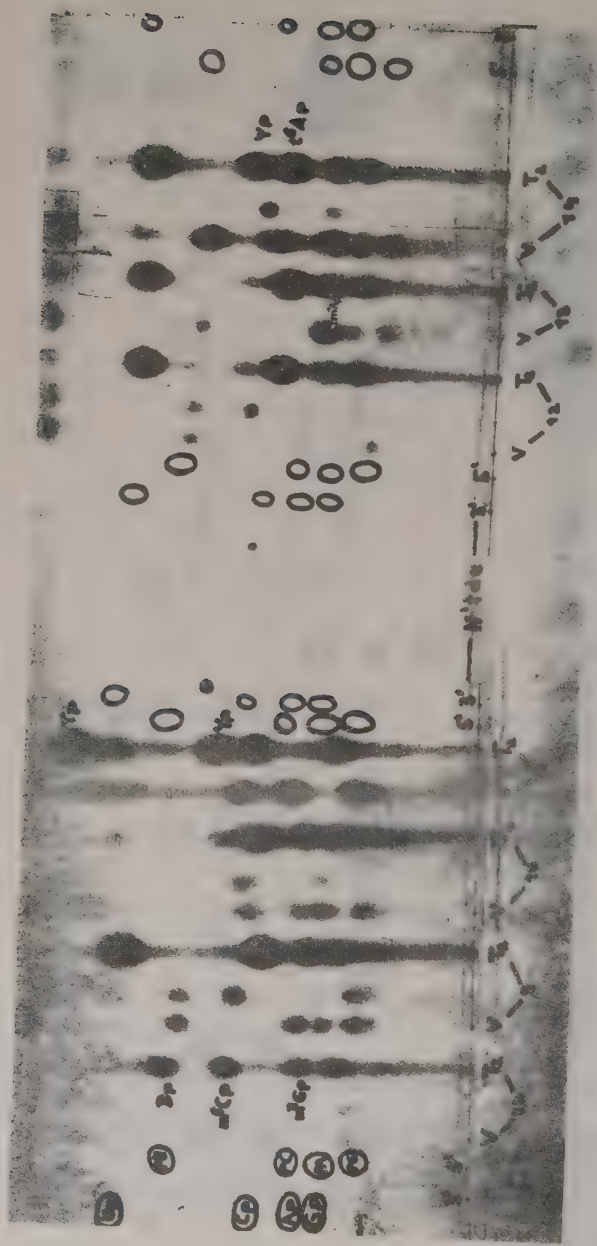


Abb. 25: Bestimmung des 5'-Endes von T_1 -Oligonukleotiden

Die Oligonukleotide wurden zum einen mit RNAase T_2 (s. 6.2.3.2.1.4.), zum anderen mit VPDE wie unter 6.2.3.2.1.7. beschrieben, gespalten. Die Produkte aus beiden Spaltungen wurden nebeneinander auf Dünnschichtplatten aufgetragen und im System a (s. 6.1.8.) chromatografiert. Als Referenzen sind die 3'- und 5'-Hauptnukleotide seitlich aufgetragen. Die Radioaktivität der Mononukleotide wurde gezählt, und aus dem Vergleich zwischen RNAase T_2 - und VPDE-Spaltmuster das 5'-Ende bestimmt. (s. 6.2.3.2.1.7.)

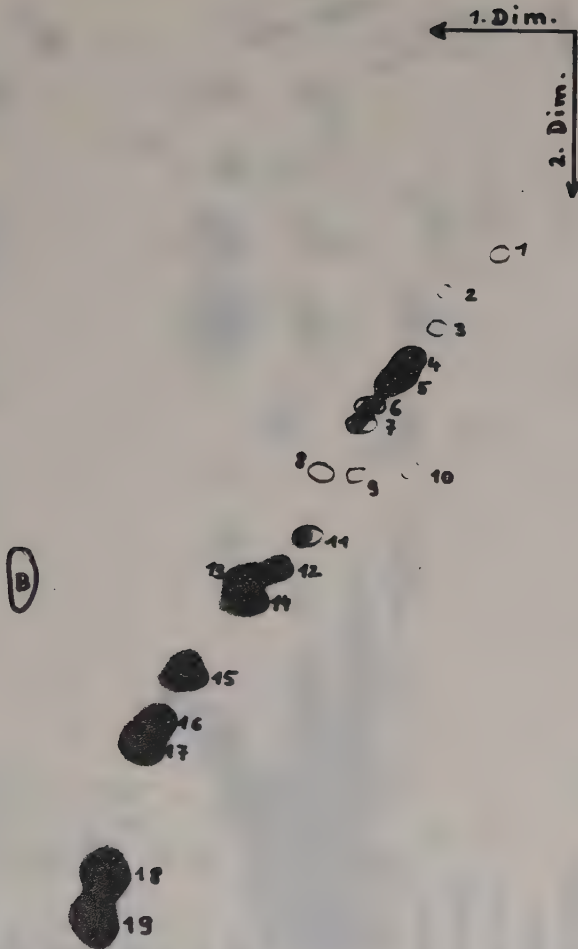


Abb. 26: Auftrennung der T_1 -Partialsplaltprodukte von $tRNA_3^{Met}$ durch zweidimensionale Gelelektrophorese

$tRNA_3^{Met}$ wurde mit RNAase T_1 partiell gespalten (s. 6.2.3.3.). Die Fragmente wurden durch zweidimensionale Gelelektrophorese, wie unter 6.2.4. beschrieben, getrennt.

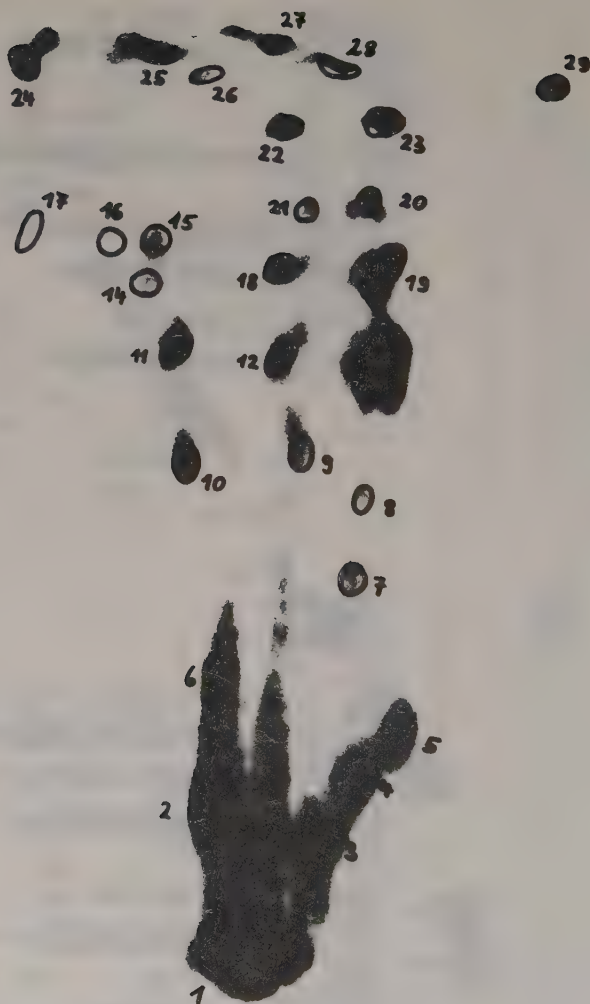


Abb. 27: Auftrennung der T_1 -Partialsplaltprodukte von $tRNA_3^{Met}$ durch Homochromatografie

$tRNA_3^{Met}$ wurde mit RNAase T_1 partiell gespalten (s. 6.2.3.3.).

Die Fragmente wurden durch Homochromatografie, wie unter 6.2.3.3. beschrieben, getrennt. 1. Dimension von links nach rechts, 2. Dimension von unten nach oben.



Abb. 28: Analyse der $\text{tRNA}_{\text{Met}}^{\text{Met}}$ -Fragmente aus der Partialspaltung
mit RNAase T_1 (Abb. 27)

Die durch Homochromatografie getrennten $\text{tRNA}_{\text{Met}}^{\text{Met}}$ -Fragmente wurden mit RNAase T_1 komplett gespalten (s. 6.2.3.2.1.2.). Die Auftrennung der T_1 -Oligonukleotide erfolgte durch Elektrophorese auf DEAE-Cellulose Papier im 7 % Puffer (s. 6.2.3.)

3.2.5. Partialspaltungen von $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ mit RNAase T_1

Nachdem die Struktur der T_1 - und RNAase A-Oligonukleotide bestimmt worden war, mußten diese in der richtigen Reihenfolge zusammengesetzt werden. Zunächst konnte auf Grund von allgemeinen Strukturhomologien in tRNAs als 5'-Ende pGp (T 5) und als 3'-Ende -CpApCpCpA_{OH} (T 4) angenommen werden. Kleinere zusammenhängende Bereiche ergaben sich bereits durch Überlappungen von RNAase A- und T_1 -Oligonukleotiden, besonders solchen, die nur ein seltenes Nukleosid enthalten. Z.B.: T 3 und T 8 werden durch P 13 verbunden, sodaß die Sequenz -GpApApGpm⁷GpDpm⁵CpGp- der Schleife (III) (vgl. Abb. 29) entsteht. Zum anderen knüpft T 11 an P 14 über das seltene Nukleotid Tp an. So entsteht die Nukleotidfolge -GpApGpApGpTp_ψpCpGp- als Teil des Stammes (e) und der Schleife (IV). Noch mehrere kleinere Sequenzen lassen sich auf diese Weise zusammen setzen, doch reicht dies für die Festlegung der vollständigen Sequenz von $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ nicht aus. Es wurden deshalb Partialspaltungen durchgeführt.

Durch kurze Inkubation von tRNA mit verdünnter T_1 Enzymlösung bei niedriger Temperatur spaltet das Enzym nicht mehr neben jedem Gp-Nukleotid. Dadurch entstehen verschieden große tRNA Fragmente. Diese werden mit T_1 Enzym vollständig nachgespalten, sodaß man die in ihnen enthaltenen T_1 -Oligonukleotide erhält, deren Struktur zuvor bestimmt wurde. Vergleicht man die in den verschiedenen Fragmenten enthaltenen Oligonukleotide, so erkennt man, daß einige von ihnen in mehreren verschiedenen Fragmenten

vorkommen. Durch sinnvolle Anordnung solcher Fragmente kann schließlich die vollständige Sequenz der tRNA abgeleitet werden. Die Partialsplattungen von tRNA₃^{Met} mit RNAase T₁ wurden, wie unter 6.2.3.3. beschrieben, durchgeführt. Das Enzym: Substrat Verhältnis betrug 1 : 1000.

3.2.6. Auftrennung der Partialsplattprodukte

Hierzu wurde ein zweidimensionales Gelelektrophoreseverfahren entwickelt. Zusätzlich wurde die Homochromatografiemethode (113) angewendet.

3.2.6.1. Entwicklung eines zweidimensionalen Gelelektrophoreseverfahrens

Das Ziel war, ein System zu erarbeiten, das in der Lage ist, auch in ihrer Struktur sehr ähnliche tRNA-Fragmente hinreichend zu trennen. Zu diesem Zweck wurden Kombinationen von Gelen verschiedener Acrylamidkonzentration und mit Puffern von unterschiedlichem pH getestet. Drei Methoden für die 1. Richtung wurden näher untersucht:

- 1) 10 % Acrylamid in einem Puffer pH 3.5 (116)
- 2) 8.5 % Acrylamid in einem Puffer pH 5.8 (117)
- 3) 10 % Acrylamid in einem Puffer pH 8.3 (118) mit 5.7 %igem Sammelgel pH 6.7 (119)

Für die 2. Richtung wurden jeweils 20 %ige Gele in einem Tris-Borat Puffer pH 8.3 verwendet. Die Trenneigenschaften der drei Kombinationen wurde für tRNA Gemische (Boehringer) als auch für T_1 -Partialsplaltprodukte von tRNA Gemischen getestet. Alle drei Methoden lieferten charakteristische, reproduzierbare Muster. Das beste Ergebnis wurde mit der 3. Methode erhalten. Mit ihr wurden auch die Partialsplaltprodukte am saubersten aufgetrennt. Deshalb wurde nach dieser Methode weitergearbeitet. Von Vorteil erwies sich eine Verlängerung des Sammelgels auf 5-6 cm.

$0.5 \text{ A}_{260}^{\text{E}}$ tRNA₃^{Met} wurden wie unter 6.2.3.3. beschrieben mit RNAase T_1 gespalten und auf ein 10 %iges Acrylamidgel aufgetragen. Die Maße der Gele und die Elektrophoresebedingungen sind in 6.2.4. angegeben. Nach der Elektrophorese wurde ein Streifen von ca. 2 cm Breite, entsprechend dem Autoradiogramm, aus dem Gel geschnitten und auf das 20 %ige Gel der 2. Dimension mit einer 10 %igen Acrylamidmischung aufpolymerisiert. Dies geschah bei 4° C und mußte sorgfältig beobachtet werden, damit der Streifen ohne Luftblasen, waagrecht und mit glatter Oberfläche einpolymerisierte.

Abb. 26 zeigt das Autoradiogramm einer zweidimensionalen Gel-elektrophorese einer partiellen T_1 -Spaltung von tRNA₃^{Met}. Es konnten 25 gut getrennte Splaltprodukte isoliert werden, von denen 19 weiter analysiert wurden. Diese wurden entsprechend dem Autoradiogramm ausgestanzt und durch Elektrophorese auf DEAE-Cellulose Papier übertragen (s. 6.2.5.), von dem sie mit 30 %

Triäthylammoniumcarbonat eluiert wurden. Anschließend wurden die Fragmente mit T_1 -Enzym im Überschuß (s. 6.2.3.1.1.) nachgespalten. Die so gewonnenen T_1 -Oligonukleotide wurden durch Elektrophorese auf DEAE Papier (67 x 85 cm) in 7 % Ameisensäurepuffer getrennt. Als Markierung lief am Rand eine durch RNAase T_1 vollständig gespaltene $tRNA_3^{Met}$ mit.

3.2.6.2. Homochromatografie

Neben der zweidimensionalen Gelelektrophorese wurden die T_1 -Partialspaltprodukte auch durch Homochromatografie getrennt. Es wurde wie in 6.2.3.3. beschrieben verfahren. Abb. 27 zeigt das Autoradiogramm einer Homochromatografie von T_1 -Partialspaltprodukten aus $tRNA_3^{Met}$. Es wurden 29 Fragmente isoliert und mit T_1 -Enzym nachgespalten. Die hierbei erhaltenen Oligonukleotide wurden wiederum durch Elektrophorese auf DEAE-Cellulose Papier getrennt, als Markierung lief ein mit T_1 vollständig gespaltene $tRNA_3^{Met}$ mit (Abb. 28). Dadurch konnte die Oligonukleotidzusammensetzung einiger $tRNA_3^{Met}$ -Fragmente anhand der Lage ihrer weiteren Spaltprodukte im Autoradiogramm der Elektrophorese sofort erkannt werden. Diejenigen Oligonukleotide, die nicht eindeutig von ihrer Position her charakterisiert werden konnten, wurden eluiert und mit T_2 -Enzym oder Alkali gespalten. Nach Chromatografie an Dünnschichtplatten im iPropanol/HCl System (s. 6.1.8.) konnten diese Oligonukleotide dann eindeutig identifiziert wer-

den. Tabelle 7 zeigt die durch zweidimensionale Gelelektrophorese und Homochromatografie getrennten Fragmente aus Partialspaltungen von $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ mit RNAase T_1 . Insgesamt wurden ca. 80 Fragmente weiter analysiert, in Tabelle 7 sind jedoch nur diejenigen aufgeführt, die zur Sequenzbestimmung notwendig waren.

Abb. 29 gibt die Nukleotidsequenz der $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ aus Brauereihefe wieder. Sie wurde in der üblichen Kleeblattform geschrieben.

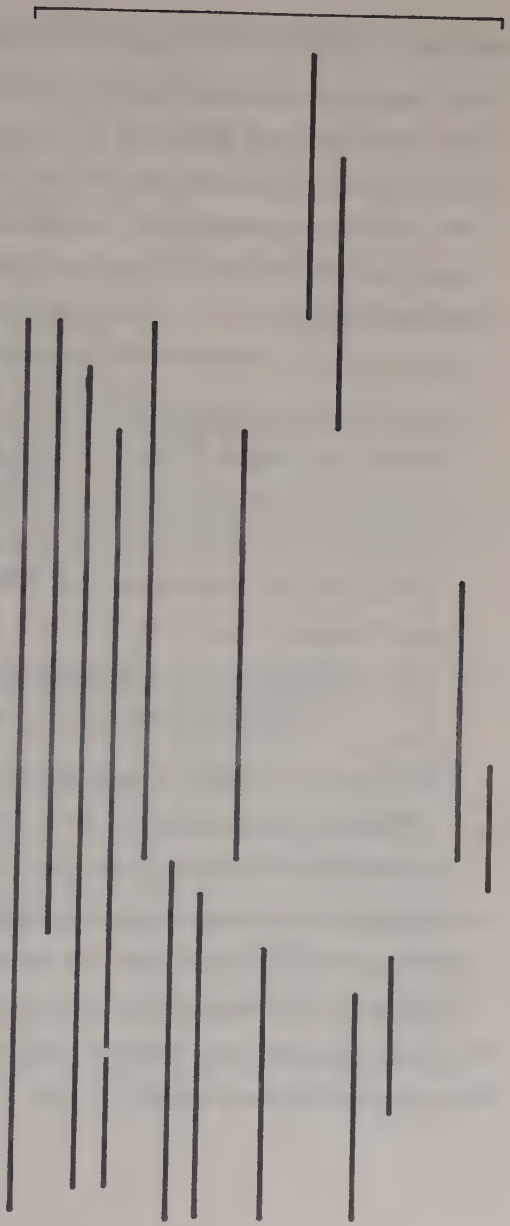
Zu Tabelle 7:

- ① : Oligonukleotide nach Spaltung von $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ mit RNAase T_1
- ② : Oligonukleotide nach Spaltung von $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ mit RNAase A
- ③ : tRNA-Fragmente nach partieller Spaltung von $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ mit RNAase T_1

Tabelle 7: Überlappungen von RNAase T₁- und RNAase A-Oligonukleotiden
Überlappungen von RNAase T₁-Partialspaltprodukten

PGCUUCAGUA²m² GCUCA² DAGGAAGAGCm² GVCAG²VCUCAUT⁶AAVCUGAAGm⁷ GDM⁵ CGAGAGT¹VCgm¹ AACCUUCUCCUGGAGCACCA^{OH}

-----] ①
-----] ②



3.2.7. Bestimmung der seltenen Nukleotide in tRNA₃^{Met}

Die Identifizierung der seltenen Nukleotide ist bei Anwendung der Techniken nach Sanger et al. besonders diffizil, da wegen der geringen Substanzmengen auf die charakteristischen UV-Spektren verzichtet werden muß. In unserem Fall war es jedoch möglich, alle Nukleotide mit seltenen Basen durch Dünnschicht- und Papierchromatografie in verschiedenen Systemen eindeutig zu identifizieren. Hierzu wurde folgendermaßen verfahren:

- a) Alle Oligonukleotide aus einem T₁- und RNAase A-"fingerprint" wurden mit RNAase A bzw. T₁ nachgespalten. Die daraus erhaltenen Oligo- und Mononukleotide wurden mit 10 %iger Piperidin-Lösung (s. 6.2.3.2.1.5.) inkubiert (Alkalispaltung). Die resultierenden Mononukleotide wurden auf Whatman 1 Papier in den Systemen d und e (s. 6.1.8.) absteigend chromatografiert.
- b) Alle Oligonukleotide aus einer anderen Serie von RNAase A- und T₁- "fingerprints" wurden mit RNAase T₂ gespalten (Abb. 24). Die aus dieser enzymatischen Spaltung erhaltenen Mononukleotide wurden an Cellulose Dünnschichtplatten in den Laufmittelsystemen a, b und c (s. 6.1.8.) chromatografiert.

In einigen Fällen wurde das Material eines Oligonukleotids geteilt und sowohl mit Alkali als auch enzymatisch gespalten, und beide Arten von Spaltprodukten nebeneinander an Dünnschichtplatten chromatografiert. Dadurch konnten alkalilabile, seltene Basen charakterisiert werden.

Seltene Nukleoside wurden in folgenden Oligonukleotiden gefunden
(zur Nomenklatur vgl. (1)):

m^2G	in T 6 und P 6
m^2G	in T 10 und P 8a
m^1A	in T 13 und P 7
t^6A	in T 14 und P 11
m^5C	in T 8 und P 3
m^7G	in T 8 und P 13
D	in T 8 und P 13, in T 7 und P 10
T	in T 11 und P 14
ψ	in T 11 und P 2, in T 10 und P 8a, in T 14 und P 11 und in T 14 und P 10

3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Versuchen zur Bestimmung der Primärstruktur von ^{32}P -tRNA₃^{Met}

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß die Reinigung von ^{32}P -tRNA₃^{Met} nach der Methode, die für nichtradioaktive tRNA₃^{Met} ausgearbeitet worden war (vgl. Abschnitt 2.1.) zu Schwierigkeiten führte (s. Kap. 3.1.), wurde nach einer neuen Anreicherungsprozedur gesucht. Zunächst wurde ein von Tener (114) angegebenes Verfahren geprüft. Hiernach konnten zwar angereicherte tRNA₃^{Met} gewonnen werden, doch waren die Ausbeuten gering. Als günstiger erwies sich die Kombination zweier BD-Cellulose Säulen: Das tRNA

Gemisch wurde an einer BD-Cellulose Säule in 7 M Harnstoff pH 3.0 (115) chromatografiert. Hierbei eluierten die tRNA^{Met}₃ gemeinsam vor der Hauptmenge der übrigen tRNAs. Anschließend wurden an einer zweiten BD-Cellulose Säule bei pH 5.0 (106) die drei Hauptspezies der methioninspezifischen tRNAs von einander getrennt. Der Reinheitsgrad der nach dieser Methode gewonnenen drei tRNA^{Met}₃ betrug 80-90 %.

Diese Methode wurde zur Anreicherung von ³²P-markierter tRNA^{Met}₃ angewendet. Die gereinigte tRNA^{Met}₃ wurde nach den Techniken von Sanger et al. (112) sequenziert. Zunächst erfolgte die Bestimmung der Sequenzen der nach RNAase T₁ und RNAase A erhaltenen Oligonukleotide. Gleichzeitig erfolgte die Identifizierung der seltenen Nukleotide. Anschließend wurde tRNA^{Met}₃ mit RNAase T₁ partiell gespalten und die so erhaltenen tRNA Fragmente durch Homochromatografie (113) und die in dieser Arbeit neu entwickelte zweidimensionale Gelelektrophorese getrennt. Die Oligonukleotidzusammensetzung der tRNA^{Met}₃-Fragmente wurde bestimmt. Durch Überlappungen der Fragmente, die die gleichen Oligonukleotide enthielten, konnte die lückenlose Folge der T₁-Oligonukleotide in der Sequenz der tRNA^{Met}₃ festgelegt werden. Damit war die Ermittlung der vollständigen Primärstruktur von tRNA^{Met}₃ aus Braueri-Hefe gelungen (Abb. 29).

Zum Zwecke einer besseren Auftrennung der T₁-Partialspaltprodukte wurde ein neues zweidimensionales Gelelektrophoreseverfahren erarbeitet. Für die 1. Dimension wurden mehrere Gele mit unter-

schiedlicher Acrylamidkonzentration und bei verschiedenen pHs getestet (vgl. 3.2.6.1.). Die besten Ergebnisse wurden erhalten, wenn die Gele der 1. und 2. Dimension im gleichen Puffer arbeiten. Als optimale Bedingungen wurden gefunden:

- | | | |
|------------------------|-----------------|--------|
| 1. Richtung: Sammelgel | 5.7 % Acrylamid | pH 6.7 |
| Trenngel | 10 % " | pH 8.3 |
| 2. Richtung Trenngel | 20 % " | pH 8.3 |

Das neu entwickelte Gelelektrophoreseverfahren wurde in dieser Arbeit erfolgreich zur Auftrennung von T_1 -Partialsplaltprodukten angewendet. Weiterhin konnte damit gesamte tRNA aus Hefe weitgehend in ihre einzelnen tRNA Spezies getrennt werden (120).

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Primärstrukturen methioninspezifischer tRNAs

4.1.1. Die Primärstruktur von tRNA₃^{Met} aus Brauereihefe

tRNA₃^{Met} ist 76 Nukleotide lang. Sie enthält 13 seltene Nukleoside: m²G, m₂²G, m⁷G, m¹A, t⁶A, m⁵C und T sind je einmal, D ist zweimal und Ψ viermal in der Sequenz enthalten. Nahezu alle Modifikationen waren vollständig. Ausnahmen hierzu wurden gefunden für D in Position 47, das nur zu 75 % vorhanden war, der Rest war U, und das Dinukleotid m₂²Gp Ψ p (P 8a) war nur zu ca. 50 % modifiziert, die andere Hälfte lag als GpUp vor.

Die in der Einleitung ausgesprochene Regel, daß ein U als dritter Buchstabe im Anticodon ein modifiziertes Adenosin benachbart hat, bestätigte sich in dieser Sequenz. Hier wurde in Position 37 ein t⁶A gefunden. Crothers et al. (121) schrieben dem 4. Nukleotid vom 3'-Ende eine Diskriminatorrolle für die Spezifität der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen zu. Für methioninspezifische tRNAs sollte dieses Nukleotid Ap sein, welches auch in tRNA₃^{Met} gefunden wurde.

Das von Levitt (122) postulierte Nukleotidpaar ist hier ein G-m⁵C Paar in den Positionen 15/48. Ein in Hefe-tRNAs im Akzeptorstamm häufig vorkommendes nicht Watson-Crick Paar U · G findet sich auch in der Sequenz von tRNA₃^{Met} in den Positionen 4/69.

Die Schleife (IV) hat die "normale" Nukleotidfolge -Tp Ψ pCpGp- was sie als nichtinitiiierende tRNA₃^{Met} kennzeichnet (1).

Eine Besonderheit fand sich im Anticodonarm in den Positionen 31 und 39. Hier stehen sich zwei Pseudouridine gegenüber. Eine solche Konstellation wurde ebenso in den nichtinitiiierenden Säugertier-tRNA₄^{Met} (123) gefunden. Inwieweit diese beiden Nukleotide miteinander Wasserstoffbrückenbindungen eingehen können, ist noch ungeklärt.

4.1.2. Vergleich der Primärstrukturen von tRNA₃^{Met} und der Initiator-tRNA₁^{Met} aus Brauereihefe

Die Nukleotidsequenzen der Initiator-tRNA₁^{Met} - sie besitzt die gleiche Primärstruktur (124) wie die von Bäckerhefe (111) - und von tRNA₃^{Met} sind sehr unterschiedlich. Sie stimmen in lediglich 42 Nukleotidpositionen überein (zum Vergleich: tRNA₃^{Met} aus Brauereihefe und tRNA_f^{Met} aus E. coli (87) zeigen 44 Nukleotidhomologien, wenn man Basenmodifikationen außer Betracht läßt). Berücksichtigt man noch, daß 13 Nukleotide ohnehin als konstant in allen bisher sequenzierten tRNAs gefunden wurde, so wird deutlich, daß tRNA₃^{Met} zur isoakzeptierenden tRNA₁^{Met} nicht mehr Sequenzhomologien aufweist, als im Durchschnitt zu irgendeiner anderen tRNA. In Abbildung 30 sind die Sequenzhomologien zwischen tRNA₃^{Met} und tRNA₁^{Met} durch Umrahmung hervorgehoben. Völlig identisch sind nur die Anticodonschleife und das 3'-Ende -ApCpCpA_{OH}. Große Ähnlichkeiten bestehen im D-Arm und in der Extraschleife (III). Die T Ψ -Schleifen zeigen nur noch partielle Ähnlichkeit

ten. Die Hauptunterschiede zwischen $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ und $\text{tRNA}_1^{\text{Met}}$ (in Klammern) sind: Die D-Schleife enthält 8 (statt 7) Nukleotide. Das letzte Basenpaar des Akzeptorstammes ist ein G-C Paar (an Stelle eines A-U Paares). Es fehlt das in Stamm (d) der $\text{tRNA}_1^{\text{Met}}$ vorkommende zweifach modifizierte Dinukleotid ApGp. Schleife (IV) hat die normale Nukleotidfolge Tp Ψ pCpGp (anstelle von ApUpCpGp).

4.1.3. Vergleich der Sequenzen der nichtinitiiierenden $\text{tRNA}_m^{\text{Met}}$ Spezies

Abb. 31 zeigt die Sequenzhomologien zwischen $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ (Brauereihefe), $\text{tRNA}_m^{\text{Met}}$ (E. coli) (88) und $\text{tRNA}_4^{\text{Met}}$ aus zwei verschiedenen Säugetierorganismen, Maus-Myeloma-Zellen (123) und Kaninchenleber (125). Die letzten beiden tRNAs scheinen identische Sequenzen zu besitzen (123).

Ein Vergleich der Primärstrukturen von $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ (Hefe) mit $\text{tRNA}_m^{\text{Met}}$ (E. coli) zeigt 46 gleiche Nukleotide in homologen Positionen. Das 3'-Ende und die gesamte Anticodonschleife sind identisch. Große Ähnlichkeiten finden sich im D-Arm und in der T Ψ C-Schleife. Es wird jedoch darauf hingewiesen, daß die D-Schleife (I) in den hier betrachteten eukaryontischen $\text{tRNA}_m^{\text{Met}}$ aus 9, die der E. coli $\text{tRNA}_m^{\text{Met}}$ nur aus 8 Nukleotiden besteht. In Abb. 31 sind die übereinstimmenden Nukleotidpositionen in den Sequenzen der $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ aus Brauereihefe und $\text{tRNA}_m^{\text{Met}}$ aus E. coli durch Umrahmung gekennzeichnet.

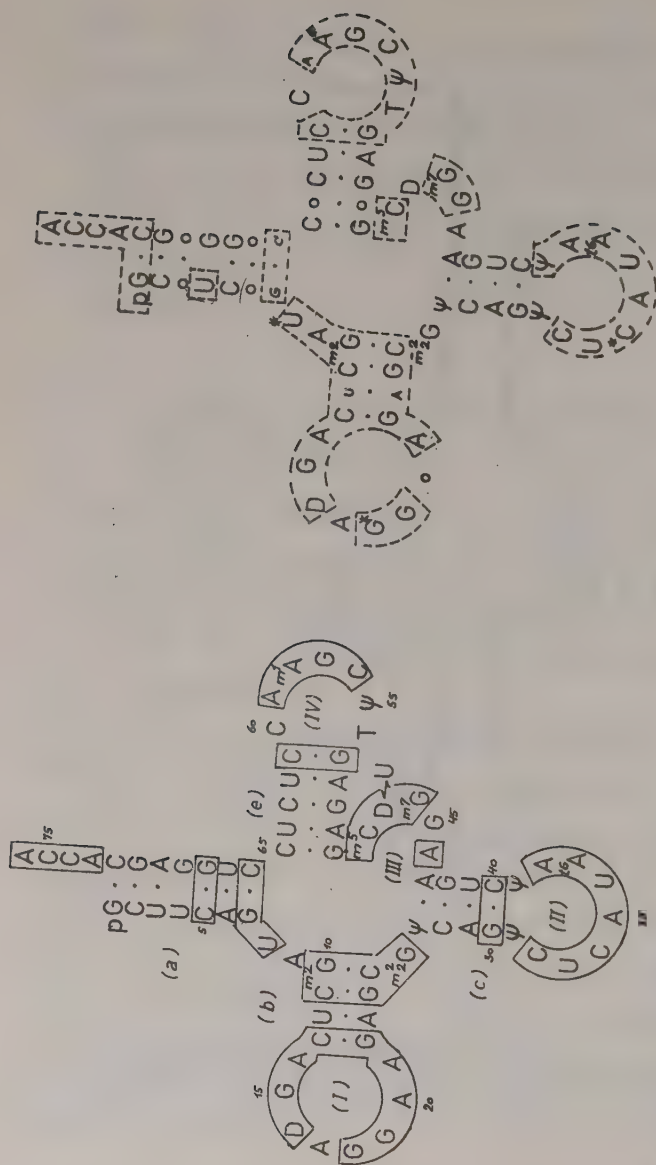


Abb. 30 (links): Vergleich der Primärstrukturen von tRNA^{Met}₃ und tRNA^{Met}₁ aus Brauereihefe
Sequenzhomologien sind eingerahmt.

Abb. 31 (rechts): Vergleich der Primärstrukturen nichtinitilierender tRNA^{Met}_{Met}
Große Buchstaben bedeuten Sequenzhomologien zwischen tRNA^{Met}₄ aus Säugetier (123, 125), Homologien zwischen tRNA^{Met}₃ aus Brauereihefe und tRNA^{Met}_m aus *E. coli* sind eingerahmt.

Vergleicht man die Primärstrukturen von tRNA₃^{Met} (Hefe) mit denen der Säugetier tRNA₄^{Met}, so erkennt man weitgehende Übereinstimmungen. Insgesamt 64 der 76 Nukleotide sind identisch. Unterschiede bestehen lediglich für drei Basenpaare in Stamm (a), je ein Basenpaar in Stamm (b) und je ein Nukleotid in den Schleifen (I) und (IV).

4.2. Das Erkennungsproblem

tRNAs treten mit mehreren Enzymen und Faktoren in Wechselwirkung. Von besonderem Interesse ist die Frage nach dem Erkennungsort der Aminoacyl-tRNA-Synthetase und der in der Proteinbiosynthese beteiligten Faktoren. Die tRNA-Protein-Komplexe sind zudem als einfaches Modell einer Nukleinsäure-Protein Wechselwirkung von allgemeiner Bedeutung.

4.2.1. Die Erkennungsregion der Aminoacyl-tRNA-Synthetase

Ein seit vielen Jahren besonders intensiv erforschter Aspekt der tRNA-Struktur gilt der Frage: Welche Nukleotide, Sequenzabschnitte oder Bereiche einer tRNA werden durch die zugehörige spezifische Synthetase erkannt? (Übersicht: 126) Es scheint gesichert, daß in der Zelle für jede Gruppe von isoakzeptierenden tRNAs eine spezifische Synthetase vorhanden ist, und, daß die Spezifität der Beladung nur auf einer spezifischen Erkennung zwischen

Aminoacyl-tRNA-Synthetase und der zugehörigen tRNA beruht. Von mehreren Gruppen wie auch in unserem Labor wurde gezeigt, daß die E. coli Methionyl-tRNA-Synthetase (MRS) nicht nur die homologen tRNA^{Met} sondern auch tRNA^{Met} aus anderen Organismen belädt. Mit der gleichen Effizienz wie in der homologen Aminoacylierungsreaktion werden die eukaryontischen Initiator tRNAs beladen (93, 97, 107, 123, 127), schwächer doch eindeutig nachweisbar werden die nichtinitiiierenden tRNA^{Met} aus Bäckerhefe (90) und Brauereihefe (107) beladen. Die nichtinitiiierenden tRNAs aus Weizenkeimen (93) und Säugetiergewebe (97) sind keine Substrate für E. coli MRS. Da man zunächst angenommen hat, daß die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen gleiche Sequenzabschnitte oder Nukleotide in den tRNAs erkennen, die von ihnen aminoacyliert werden, sollte auch ein Vergleich der Primärstrukturen der tRNA^{Met}, die von der MRS aus E. coli beladen werden, Aufschlüsse darüber ergeben, welche Regionen der tRNA für die Erkennung durch die MRS aus E. coli wesentlich sind.

Ein Vergleich zwischen tRNA^{Met}₃ und tRNA^{Met}₁ aus Hefe könnte Anhaltspunkte für die Erkennungsregion der MRS aus Hefe erbringen.

In den Abb. 32 a - c sind in eine dreidimensionale tRNA Struktur die gemeinsamen Nukleotide und Nukleotidpaare verschiedener tRNA^{Met} eingezeichnet. Diese dreidimensionale Struktur wurde von Kim et al. (4) und Robertus et al. (5) für die tRNA^{Phe} aus Hefe aus Röntgenstrukturdaten ermittelt. Auf Grund gemeinsamer Ele-

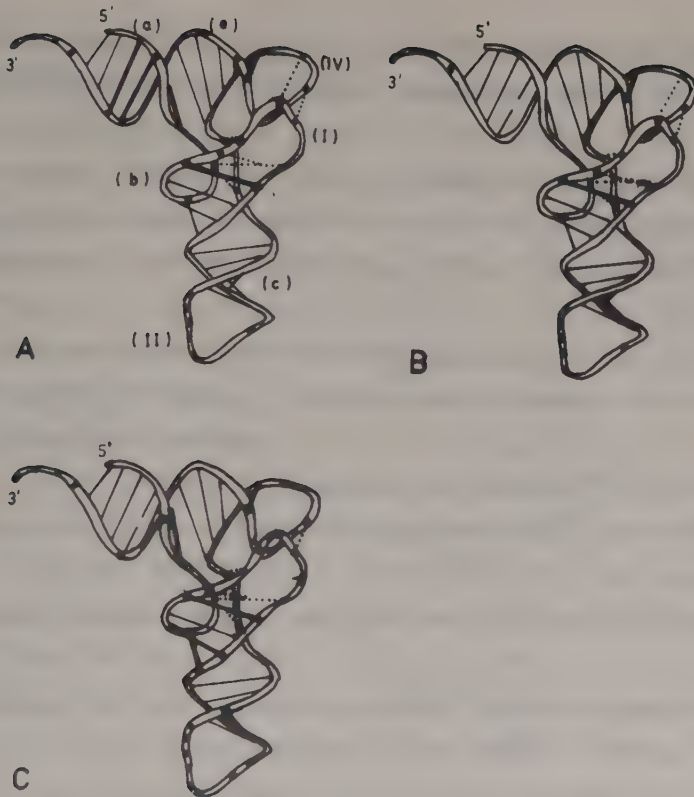


Abb. 32: Zum Erkennungsproblem der Aminoacyl-tRNA-Synthetase.
Darstellung von Sequenzhomologien in dreidimensionalen
tRNA Strukturen (vgl. Kap. 4.2.2.!))

Homologe Nukleotide und Nukleotidpaare sind dick gezeichnet,
Tripelbasen sind durch punktierte Linien verbunden.

Abb. 32a: Vergleich derjenigen tRNA^{Met}, die durch E. coli MRS
gut beladen werden.

Abb. 32b: Vergleich derjenigen tRNA^{Met}, die durch E. coli MRS
beladen werden, wenn auch z.T. nur in geringem Ausmaß.

Abb. 32c: Vergleich der tRNA^{Met}₃ und tRNA^{Met}₁ aus Brauereihefe

mente in den Primärstrukturen kann man jedoch annehmen, daß die $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ eine nahezu identische Tertiärstruktur wie tRNA^{Phe} besitzt.

Abb. 32a gibt die gemeinsame Nukleotide der $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ an, die mit nahezu der gleichen Effizienz von MRS aus *E. coli* beladen werden ($\text{tRNA}_f^{\text{Met}}$ und $\text{tRNA}_m^{\text{Met}}$ aus *E. coli*, $\text{tRNA}_1^{\text{Met}}$ aus Hefe und Säugetier $\text{tRNA}_1^{\text{Met}}$).

Abb. 32b zeigt die Homologien all der tRNAs, welche von der *E. coli* MRS noch beladen werden, wenn auch zum Teil in geringerem Ausmaß. Zusätzlich zu den in Abb. 32a verglichenen tRNAs ist hier die $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ aus Hefe aufgenommen.

Abb. 32c zeigt die gemeinsamen Nukleotide in $\text{tRNA}_1^{\text{Met}}$ und $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ aus Hefe.

Folgende Erkenntnisse lassen sich aus den Darstellungen ableiten:

- 1.) Wenn gemeinsame tRNA Bereiche von der *E. coli* MRS erkannt werden, kommen dafür nur das 3'-Ende und ein Teil der Anticodonschleife in Frage, denn die im Zentrum der tRNA gefundenen Gemeinsamkeiten beziehen sich ausschließlich auf für alle tRNAs konstante oder in diesen Positionen überaus häufig vorkommende Nukleotide.
- 2.) Ein Vergleich zwischen Abb. 32a und Abb. 32b zeigt, daß diejenigen tRNAs, welche gleich gut von der MRS aus *E. coli* beladen werden, zusätzliche gemeinsame Nukleotidpaare im Akzeptorstamm besitzen. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit den

Vorstellungen von Ebel et al. (128), die annehmen, daß der größte Beitrag zur Spezifität der Beladungsreaktion durch die richtige Orientierung des 3'-terminalen Nukleosids A im aktiven Zentrum des Enzyms geleistet wird. Hierfür sollen Nukleotide nahe des Akzeptorendes verantwortlich sein. Dies bedeutet, daß die gemeinsamen Strukturmerkmale der in Abb. 32b verglichenen tRNAs ausreichen für eine Bindung der tRNAs an die E. coli MRS. Die zusätzlichen gemeinsamen Nukleotidpaare der in Abb. 32a verglichenen tRNAs erhöhen die Reaktionsgeschwindigkeit und damit die Effizienz der Beladung.

3.) Abb. 32c läßt außer den konstanten Nukleotiden relativ große Gemeinsamkeiten im zentralen Bereich der $\text{tRNA}_1^{\text{Met}}$ und $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ aus Hefe erkennen. Zudem besitzen beide tRNAs neben der völlig identischen Anticodonschleife mehrere gemeinsame Nukleotidpaare in den Schleifen (a), (b), (c) und (d). Interessant wäre eine Einbeziehung der Primärstruktur von $\text{tRNA}_2^{\text{Met}}$ (diese ist noch nicht ermittelt!) in die Betrachtung, da die $\text{tRNA}_2^{\text{Met}}$ natürlich ebenfalls von Hefe MRS beladen wird. Sicherlich würden dadurch die gefundenen Gemeinsamkeiten in den Sequenzen der Hefe $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ weiter eingeschränkt werden. Eine Aussage über die tRNA Erkennungsorte der MRS aus Hefe zu wagen, erscheint deshalb in diesem Stadium als verfrüht.

Bei der Erörterung des Erkennungsortes der Aminoacyl-tRNA-Synthetase sollte nicht außer Acht gelassen werden, daß die tRNA in einem Aminoacyl-tRNA Komplex möglicherweise eine andere Kon-

formation besitzt, als im freien Zustand. Eine direkte Antwort über die räumliche Anordnung der tRNA zur Aminoacyl-tRNA-Synthetase in der Beladungsreaktion wird deshalb erst eine Röntgenstrukturanalyse des Komplexes bringen. Zu bedenken ist ferner - auf Grund der bisherigen Ergebnisse aus Versuchen zu diesem Problem - daß die Beladungsreaktion nicht nach einem einheitlichen Schema verläuft.

4.2.2. Die Erkennungsregion der Faktoren in der Proteinbiosynthese

Die Aminoacylierungsreaktion ist ein Vorgang, der alle tRNAs betrifft. Ein besonderer Fall der Erkennung von tRNA Strukturen durch ein Protein liegt für die methioninspezifischen tRNAs vor. Während nur die Initiator tRNA_f^{Met} von dem Initiationsfaktor IF-2 erkannt werden, bilden umgekehrt nur die tRNA_m^{Met} mit dem Elongationsfaktor EF-T einen Komplex. Welche Nukleotide oder Nukleotidfolgen determinieren die tRNA_f^{Met} zur Initiation, die tRNA_m^{Met} zur Elongation der Proteinkette?

Ein Vergleich zwischen den Primärstrukturen der initiiierenden tRNA₁^{Met} und der nichtinitiiierenden tRNA₃^{Met} aus Brauereihefe soll der Lösung dieses Problems dienen (Abb. 30 und 32c).

Am auffallendsten ist die unterschiedliche Konstruktion der Schleife (IV) in beiden tRNAs. Sicherlich ist die veränderte Sequenz-ApUpCpGp- in tRNA₁^{Met} an Stelle von -TpvpCpGp- in tRNA₃^{Met}

mittelbar oder unmittelbar dafür verantwortlich, daß diese tRNA als Initiator-tRNA erkannt wird. Ob jedoch diese Nukleotidaustausche die einzige charakteristische Information für die Erkennung dieser tRNA durch die Initiationsfaktoren darstellen, kann heute noch nicht beantwortet werden. Die Sequenzuntersuchungen dieser Arbeit zeigen deutlich, daß auch in anderen Abschnitten der Primärstrukturen der hier betrachteten tRNAs größere Unterschiede bestehen. Dies gilt insbesondere für die Stämme (a), (c) und (e). Somit können auch diese Nukleotidfolgen an der funktionellen Unterscheidung der beiden tRNAs beteiligt sein.

In diesem Zusammenhang wäre wiederum die Kenntnis der vollständigen Nukleotidsequenz der $\text{tRNA}_2^{\text{Met}}$ aus Hefe hilfreich. Die in dieser Arbeit begonnenen Sequenzuntersuchungen an $\text{tRNA}_2^{\text{Met}}$ (vgl. Kap. 2.4.) zeigen bereits, daß diese tRNA der $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ nahesteht, sie besitzt u.a. wie diese die normale Nukleotidfolge -Tp Ψ pCpGp- in Stamm (e).

4.3. Evolutionsaspekte

Ein Vergleich der für eine Aminosäure spezifischen tRNAs aus verschiedenen Organismen spiegelt die phylogenetische Verwandtschaft dieser Lebewesen wieder. Als Beispiel seien die Primärstrukturen der nichtinitilierenden methioninspezifischen tRNAs aus *E. coli*, Hefe und zweier Säugetierorganismen angeführt. Vergleicht man $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ aus Hefe mit $\text{tRNA}_m^{\text{Met}}$ aus *E. coli*, so lassen

sich in den Primärstrukturen kaum Ähnlichkeiten feststellen (vgl. Abb. 31). Betrachtet man jedoch die Nukleotidsequenzen von $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ (Hefe) mit der Säugetier $\text{tRNA}_4^{\text{Met}}$, so findet man in 64 von 76 möglichen Positionen identische Nukleotide (vgl. Abb. 31). Lange Sequenzabschnitte wurden während der Evolution stabil gehalten. Selbst das außergewöhnliche $\psi\text{p}\cdot\psi\text{p}$ Paar in Stamm (c) ist in beiden tRNAs enthalten. Die beiden Säugetier $\text{tRNA}_4^{\text{Met}}$ aus Maus-Myeloma und Kaninchenleber haben bereits völlig identische Nukleotidsequenzen.

Ein ähnliches Bild ergibt sich aus dem Vergleich der initierenden $\text{tRNA}_5^{\text{Met}}$ aus den oben betrachteten Organismen. Hefe besitzt demnach zu den Säugetieren eine wesentlich größere phylogenetische Verwandtschaft als zu Bakterien.

5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Experimente dieser Arbeit gliedern sich in zwei Abschnitte. Im ersten Teil wurden Untersuchungen zur Multiplizität der methioninspezifischen tRNAs aus Brauereihefe durchgeführt. Der zweite Teil beschäftigte sich mit der Ermittlung der vollständigen Primärstruktur der nichtinitiiierenden tRNA₃^{Met}.

Brauereihefe enthält drei Hauptspezies methioninspezifischer tRNAs. Es wurden Methoden zur Reindarstellung dieser tRNAs^{Met} entwickelt. Hierfür wurden verschiedene Kombinationen mehrerer Säulenchromatografien durchgeführt. Für tRNA₃^{Met} erwies sich eine Kombination in der Reihenfolge BD-Cellulose, DEAE-Sephadex, RPC 3 und RPC 4 als erfolgreich. Ähnliche säulenchromatografische Schritte wurden zur Reindarstellung von tRNA₁^{Met} und tRNA₂^{Met} angewandt.

Der Reinheitsgrad der so gewonnenen tRNAs^{Met} wurde durch mehrere Tests ermittelt. Hierzu zählte der Beladungstest mit ¹⁴C-Methionin, Beladung mit angereicherter MRS, Renaturierung der tRNA und schließlich Beladungsversuche mit einem Aminosäuregemisch. Der Reinheitsgrad lag hiernach für die drei tRNAs^{Met} zwischen 80 und 90 %.

Die weiteren Versuche des ersten Abschnittes galten dem Vergleich der drei Haupt-tRNAs^{Met} aus Brauereihefe. Hierzu wurden die gereinigten tRNAs mit RNAase T₁ gespalten und die Spaltprodukte an einer DEAE-Cellulose Säule aufgetrennt. Enzymatische

Spaltungen und Auftrennung der Produkte erfolgten unter identischen Bedingungen, so daß ein Vergleich der Spaltmuster möglich war. Die Oligonukleotide wurden isoliert und mit RNAase A und anschließend mit einem PME/SPDE Gemisch nachgespalten. Die so erhaltenen Nukleoside wurden durch UV Spektren bei pH 7 und pH 2 und durch Dünnschichtchromatografie identifiziert.

Aus obigen Versuchen konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

- 1) Die drei untersuchten methioninspezifischen tRNAs stellen individuelle tRNAs mit unterschiedlichen Primärstrukturen dar.
- 2) Die Nukleotidzusammensetzung vieler T_1 -Oligonukleotide konnte bestimmt werden.
- 3) $tRNA_2^{Met}$ und $tRNA_3^{Met}$, nicht jedoch $tRNA_1^{Met}$ enthalten das Oligonukleotid -Tp Ψ pCpGp-.
- 4) Der Dihydrouridingehalt von $tRNA_1^{Met}$ und $tRNA_3^{Met}$ wurde zu 2 Mol pro Mol tRNA ermittelt.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurden Versuche zur Bestimmung der Primärstruktur von - mit ^{32}P radioaktiv markierter - $tRNA_3^{Met}$ durchgeführt. Hierfür war es nötig, eine neue Reinigungsprozedur für die methioninspezifischen tRNAs auszuarbeiten, da sich die vorgenannte Methode als zu zeitraubend und - wegen der kurzen Halbwertszeit des Isotops ^{32}P - als zu verlustreich erwies. Zunächst wurde nach dem von Tener et al. angegebenen Verfahren gearbeitet, doch wurden hiermit nur geringe Ausbeuten an $tRNA_3^{Met}$ erzielt. Schließlich brachten zwei aufeinanderfolgen-

de Chromatografien an BD-Cellulose bei pH 3.0 und bei pH 5.0 den erwünschten Erfolg. In lediglich zwei chromatografischen Schritten konnten die drei tRNA^{Met}₃ zu ca. 80-90 % rein erhalten werden. Damit war eine schnelle Anreicherungs-methode für die drei Hauptspezies der methioninspezifischen tRNAs aus Brauereihefe gefunden. Auf diesem Weg konnten die tRNA^{Met}₃ in genügender Menge und für eine Sequenzierung ausreichendem Reinheitsgrad isoliert werden.

Hefe wurde mit ³²P-Phosphat angezogen und die tRNA nach der Phenolmethode extrahiert. Anschließend wurde die tRNA^{Met}₃, wie im vorhergehenden Absatz beschrieben, angereichert. Die gereinigte tRNA^{Met}₃ wurde mit RNAase T₁ und RNAase A gespalten. Hierbei wurden Oligonukleotide erhalten, die durch zweidimensionale Papier-elektrophorese ("fingerprints") aufgetrennt wurden. Die Nukleotidsequenzen dieser Oligonukleotide wurden durch eine Reihe nachfolgender enzymatischer Spaltungen bestimmt. Die Auftrennung der Spaltprodukte erfolgte durch Papierelektrophorese oder Dünnschichtchromatografie. Seltene Basen wurden durch Papier- oder Dünnschichtchromatografie der Mononukleotide identifiziert.

Die nächste Aufgabe bestand darin, die in ihrer Nukleotidsequenz bestimmten Oligonukleotide in der richtigen Reihenfolge anzuordnen. Hierzu wurde tRNA^{Met}₃ unter limitierenden Bedingungen partiell mit RNAase T₁ gespalten. Die Auftrennung der resultierenden tRNA Fragmente erfolgte auf zweierlei Weise. Zum einen wurde Hochdruckflüssigchromatografie angewandt, ein zweidimensionales Verfahren,

welches Elektrophorese in der ersten Richtung mit Chromatografie in der zweiten Richtung verbindet. Hierbei wurden über 40 getrennte Fragmente erhalten, von denen 29 weiter analysiert wurden.

Zum anderen wurde eine zweidimensionale Gelelektrophorese entwickelt. Nach mehreren Versuchen mit Gelen unterschiedlichen Acrylamidgehaltes und bei verschiedenen pHs, erwies sich schließlich die Kombination von 10 %igem Gel bei pH 8.3 mit Sammelgel für die erste Richtung und 20 %igem Gel ebenfalls bei pH 8.3 für die zweite Richtung als optimal. Diese Methode wurde zur Auftrennung der tRNA Fragmente angewendet. Es wurden ca. 25 Fragmente erhalten, von denen 19 weiter analysiert wurden. Die zweidimensionale Gelelektrophorese erwies sich zudem als hervorragend geeignet, gesamte tRNA aus Hefe aufzutrennen (120).

Die durch Homochromatografie oder zweidimensionale Gelelektrophorese getrennten Partialspaltprodukte wurden isoliert und mit RNAase T₁ vollständig nachgespalten. Die Analyse der tRNA₃^{Met} Fragmente ergab, daß einige T₁-Oligonukleotide in mehreren Partialspaltprodukten enthalten waren. Diese Überlappungen erlaubten schließlich die vollständige Ableitung der Primärsequenz von tRNA₃^{Met} aus Brauereihefe.

tRNA₃^{Met} ist 76 Nukleotide lang und besitzt 13 modifizierte Nukleoside (4Ψ, 2 D, T, m¹A, m²G, m₂²G, m⁶G, m⁵C und t⁶A). Die meisten Modifikationen waren vollständig. Ausnahmen hierzu bildeten D in Position 47, das nur zu 75 % vorhanden war, der Rest

lag als U vor, und das Dinukleotid $m_2^2G\psi p$, welches nur zu 50 % modifiziert war, der Rest war GpUp. $tRNA_3^{Met}$ besitzt wie die anderen nichtinitiiierenden $tRNAs^{Met}$ (1), die "normale" Nukleotidfolge Tp ψ pCpGp in Schleife (IV). Auffallendstes Strukturmerkmal sind die beiden gegenüberstehenden $\psi\psi$ im Anticodonstamm in den Positionen 31 und 39.

Aus Vergleichen zwischen den Primärstrukturen von $tRNA_3^{Met}$ aus Brauereihefe und anderen methioninspezifischen tRNAs lassen sich folgende Ergebnisse ableiten:

Die Sequenzhomologien zwischen $tRNA_3^{Met}$ und $tRNA_1^{Met}$, beide aus Hefe, sind gering. Deshalb lassen sich keine sicheren Aussagen über den Erkennungsort der MRS aus Hefe machen. Auch die Bereiche, welche für die funktionelle Unterscheidung der beiden tRNAs in der Proteinbiosynthese verantwortlich sind, lassen sich - wegen der großen Sequenzunterschiede - nicht angeben.

Die methioninspezifischen tRNAs, welche durch die MRS aus E. coli gut beladen werden, zeigen untereinander größere Sequenzhomologien, als diejenigen, welche nur zu einem geringen Ausmaß beladen werden. Letztere haben nur noch die in allen tRNAs konstanten Nukleotide gemeinsam. Daher sind im Falle der MRS aus E. coli keine tRNA-Sequenzabschnitte, welche an der Wechselwirkung mit der Synthetase beteiligt sind, erkennbar. Offenbar ist für eine schnelle Aminoacylierungsreaktion eine bestimmte Gesamtstruktur der tRNA im Komplex mit der Aminoacyl-tRNA-Synthetase wesentlich, für deren Zustandekommen auch voneinander entfernt

liegende Nukleotide oder Nukleotidsequenzen verantwortlich sind. Entwicklungsgeschichtlich steht Hefe den Säugetieren wesentlich näher als den Bakterien. Dies wurde an dem Vergleich der Primärstrukturen der nichtinitilierenden tRNA^{Met}₃ gezeigt. Während die Nukleotidsequenzen von tRNA^{Met}₃ aus Hefe und tRNA^{Met}_m aus E. coli kaum Homologien aufweisen, besitzen tRNA^{Met}₃ (Hefe) und tRNA^{Met}₄ (Säugetier) 64 gleiche Nukleotide - von insgesamt 76 - in identischen Positionen.

6. Methoden

6.1. Methoden zu den Untersuchungen zur Multiplizität der methioninspezifischen tRNAs in Brauereihefe

6.1.1. Säulenchromatografien

Die Säulen wurden mit den entsprechenden, vorbehandelten (s. Materialien) Adsorptionsmitteln gefüllt. Alle BD Cellulose-, DEAE Cellulose- und RPC Säulen wurden unter Druck gestopft, der Puffer wurde mit einer peristaltischen Schlauchpumpe durch die Säule gepreßt. Der Druck wurde auf die optimale Laufgeschwindigkeit eingestellt und lag zwischen 0.2 und 1.5 atü. Die RPC Säulen hatten einen Heizmantel und wurden bei 37° C, alle übrigen Säulen bei Raumtemperatur (ca. 21° C) betrieben. Es wurde durchwegs mit linearen Gradienten eluiert.

Zur Erlangung einer besseren Übersichtlichkeit werden standardisierte Säulen im folgenden tabellarisch beschrieben. Die Mengenangaben für Gradienten beziehen sich auf das Gesamtvolumen.

6.1.1.1. Präparative BD Cellulose Säule

Säule: 4 x 120 cm

Puffer: 0.3 M NaCl, 0.01 M MgCl₂, 0.05 M Na-Azetat pH 5.0

Gradient: 4000 ml von 0.3 bis 1.2 M NaCl

Fraktionsvolumen: 12 ml

Flußgeschwindigkeit: 12 min pro Fraktion

6.1.1.2. Analytische BD Cellulose Säule

Säule: 1 x 50 cm

Puffer: 0.5 M NaCl, 0.01 M $MgCl_2$, 0.05 M Na Azetat pH 5.0

Gradient: 1500 ml von 0.5 bis 1.2 M NaCl

Frakt. vol.: 4.5 ml

Flußgeschw.: 3 min pro Fraktion

6.1.1.3. DEAE Sephadex Säule

Säule: 4 x 120 cm

Puffer: 0.375 M NaCl, 0.01 M $MgCl_2$, 0.01 M Tris-HCl pH 7.3

Gradient: 10 l von 0.375 M bis 0.45 M NaCl

Frakt. Vol.: 15 ml

Flußgeschw.: 25 min pro Fraktion

6.1.1.4. RPC 3 Säule

Säule: 1.8 x 240 cm

Puffer: 0.2 M NaCl, 0.01 M $MgCl_2$, 0.01 M Na-Azetat pH 4.5

Gradient: 8000 ml von 0.3 M bis 0.5 M NaCl

Frakt. Vol.: 10 ml

Flußgeschw.: 5 min pro Fraktion

6.1.1.5. RPC 4 Säule

Säule: 0.7 x 200 cm

Puffer: 0.45 M NaCl, 0.01 M MgCl_2 , 0.01 M Na-Azetat pH 4.5

Gradient: 4000 ml von 0.45 bis 0.6 M NaCl

Frakt. Vol.: 10 ml

Flußgeschw.: 7 min pro Fraktion

6.1.1.6. DEAE Cellulose Säule

Säule: 0.3 x 80 cm

Puffer: 7 M Harnstoff, 0.01 M Tris-HCl pH 7.5

Gradient: 500 ml von 0.0 M bis 0.3 M NaCl

Frakt. Vol.: 1 ml

Flußgeschw.: 3 min pro Fraktion

6.1.2. Beladung von tRNA mit radioaktivem Methionin im präparativen Maßstab

25 $\text{A}_{260}^{\text{E}}$ tRNA wurden in 1 ml des in 6.1.3. beschriebenen Inkubationsansatzes bei 37° C 15 bis 20 min inkubiert. Anschließend wurde die Lösung auf eine Sephadex G 25 Säule (1 x 40 cm) gegeben und mit entionisiertem Wasser eluiert. Hierbei wird die beladene tRNA von niedermolekularen Stoffen wie ATP und ^{14}C -Methionin abgetrennt.

6.1.3. Bestimmung der Methionin-Akzeptoraktivität von tRNA Fraktionen

Je nach Anreicherungsgrad der tRNA wurden 0.1 bis 2.5 A_{260}^E tRNA in 0.1 ml bei 37° C 15 min inkubiert. Das Inkubationsgemisch enthielt 1 μ l Methionyl-tRNA-Synthetase Rohenzym (10 m E/ml) und 0.005 Mol 14 C-L-Methionin, 1 μ Mol $MgCl_2$, 1.5 μ Mol NH_4Cl_2 , 2.5 μ Mol Tris-HCl pH 7.5. Nach der Inkubation wurde die Aminoacyl-tRNA mit 5 %iger eiskalter Trichloressigsäure (TCA) gefällt, über Glasfaserfilter abfiltriert, dreimal mit kalter TCA und anschließend mit kaltem Äthanol gewaschen. Die getrockneten Filter wurden mit Toluol Szintillator versetzt und die Radioaktivität gemessen.

6.1.4. Radioaktivitätsmessung

Radioaktivität in Säulenfraktionen wurden in Bray Szintillator (130) gemessen, wobei das Verhältnis wässrige Probe Szintillator 1 : 10 nicht überschritten wurde. Radioaktivität auf Filtern wurde in Toluol Szintillator (4 g Omnifluor in 1 l destilliertem Toluol) gemessen.

6.1.5. Spaltung von tRNA mit T_1 RNAase

20 A_{260}^E der gereinigten tRNA^{Met} in ca. 3 ml wurden 4 h gegen entionisiertes Wasser dialysiert. Anschließend wurde im Autotil-

trator auf pH 7.5 mit 1 m M NaOH eingestellt. Nach Zugabe von 50 μ l T_1 RNAase Lösung (5000 E/ml in 0.01 M Tris-HCl pH 7.5) wurde 1.5 Stdn bei 45° C inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 50 μ l T_1 Lösung wurde weiter 1.5 h. inkubiert. Das Endvolumen war 6 ml. Die Lösung wurde 7 M an Harnstoff gemacht und auf eine DEAE Cellulose Säule aufgezogen.

6.1.6. Isolierung der Fraktionen der DEAE Cellulose Säule (6.1.1.6.)

Die auf Grund des Absorptionsprofils vereinigten Fraktionen wurden dreifach mit H_2O verdünnt und über DEAE Cellulose Papier filtriert. Die mit Wasser gewaschenen und getrockneten Filter wurden mit Triäthylammoniumcarbonat pH 9.5 eluiert und das Eluat im Exsikkator über P_2O_5 eingetrocknet.

6.1.7. Enzymatische Nachspaltung der T_1 -Oligonukleotide

6.1.7.1. Spaltung mit RNAase A

Die eingetrockneten Proben wurden mit 20 μ l H_2O aufgenommen, anschließend mit 20 μ l 0.02 M Bicarbonatlösung pH 9.3 und 10 μ l RNAase A (150 E/ml) versetzt, und 2.5 h bei 37° C inkubiert.

6.1.7.2. Spaltung mit PME/SPDE

Die Spaltung erfolgte durch gleichzeitige Zugabe von 5 μ l PME (1 mg/ml) und 5 μ l SPDE (1800 E/ml) zu einer Probe, die in 20 μ l einer 0.02 M Bicarbonatlösung pH 9.3 gelöst war. Inkubation war 4 h. bei 37° C.

6.1.8. Chromatografische Systeme

a) 1Propanol/Konz. HCl/H ₂ O	114/29/24	ml
b) ges. NH ₄ SO ₄ /Na-Azetat pH 5.5/1Propanol	80/18/2	ml
c) 1Buttersäure/0.5 N NH ₃	50/30	ml
d) Propanol/konz. HCl/H ₂ O	680/176/114	ml
e) 1Propanol/Konz. NH ₃ /H ₂ O	700/10/300	ml

6.1.9. Dünnschichtelektrophorese

Zur Auftrennung von Oligo- und Mononukleotiden wurden die Proben auf Dünnschichtplatten aufgetragen. Die Platten wurden mit einer 0.02 M NH₄-Azetat Lösung pH 3.5 besprüht und in waagrechter Lage bei 800 V 1.5 h. elektrophoretisiert. Die Dünnschichtplatten wurden auf ca. 10° C gekühlt.

6.1.10. Papierelektrophorese

Oligonukleotide wurden auf Papier (Shleicher und Schüll 2043 Mgl) von 60 cm Länge in 0.18 M NH_4 -Formiat Puffer pH 2.7 bei 3 KV getrennt. Die Elektrophoreseapparatur war auf 4° C gekühlt.

6.1.11. Renaturierungsversuche

tRNA^{Met}₃ wurde in 0.01 M Cacodylat, 0.01 M MgCl_2 , und 0.001 M EDTA pH 6.8 gelöst. Die Lösung enthielt ca. 2 A₂₆₀ E/ml. Es wurden 2 x je 50 µl entnommen und die Akzeptoraktivität für Methionin bestimmt. Die übrige Lösung wurde 5 Min. auf 60° C erhitzt und bei Raumtemperatur abgekühlt. Es wurden wieder 2 x je 50 µl entnommen und die Akzeptoraktivität für Methionin bestimmt. Die Werte für nicht erhitzte und erhitzte (renaturierte) tRNA Proben wurden verglichen. In einem weiteren Versuch wurde der tRNA pro Test 1 µl einer 1 M CTP Lösung zugesetzt und nach Renaturierung die Methionin-Akzeptoraktivität ermittelt.

6.1.12. Bestimmung des Dihydrouridingehaltes in den tRNA^{Met}s

Zu 1 ml einer gereinigten tRNA^{Met}-Lösung in einer 1 ml Küvette wurden 0.1 ml einer 1 N NaOH zugegeben. Bei 235 nm wurde die Abnahme der Extinktion verfolgt. Nach ca. 20 min war die Reaktion beendet. Die Werte wurden auf halblogarithmischem Papier gegen die Zeit aufgetragen, und im Diagramm die Extinktion auf die Zeit Null extrapoliert.

6.2. Methoden zu den Versuchen zur Bestimmung der Primärstruktur von tRNA₃^{Met}

6.2.1. Anzucht von ³²P markierter Hefe

1 l Minimalmedium enthielt 2 g Zitronensäure, 10 g Glukose, 2.5 g Pepton, 13 mg Glyceromonophosphat, 0.5 mg Calciumpanthothenat, 10 µg Biotin, 2.3 g NaCl, 0.3 mg FeCl₃, 0.74 g KCl, 0.11 g CaCl₂, 0.01 g Na₂SO₄ und 0.102 mg MgCl₂. 6 H₂O. Die Lösung wurde mit NaOH auf pH 5.5 eingestellt und sterilisiert. 3 bis 4 l Medium wurden mit 100 m Ci ³²P-Phosphat und 10 ml einer über Nacht gewachsenen Vorkultur versetzt. Die Hefe wurde ca. 16 h bei 28°C unter Belüftung angezogen. Nach dem Abzentrifugieren wurde die tRNA nach der üblichen Phenolmethode gewonnen.

6.2.2. Säulenchromatografien

Die Säulen wurden wie in 6.1.1. geschildert betrieben.

6.2.2.1. DEAE-Cellulose Säule

Säule: 2 x 30 cm
Puffer: 0.1 M NaCl, 0.01 M MgCl₂, 0.02 M Na-Azetat pH 6.5
Gradient: 1600 ml von 0.1 M bis 1.1 M NaCl
Fraktionen: 7 ml in 6 min.

6.2.2.2. Analytische BD-Cellulose Säule pH 3.0

Säule: 1 x 50 cm
Puffer: 0.22 M NaCl, 7 M Harnstoff pH 3.0
Gradient: 800 ml von 0.22 M bis 0.4 M NaCl
Frakt. Vol.: 2.2 ml
Flußgeschw.: 7 min pro Frakt.

6.2.2.3. Analytische BD-Cellulose Säule pH 5.0

Säule: 0.6 x 40 cm
Puffer: 0.5 M NaCl, 0.01 M $MgCl_2$, 0.02 M Na-Azetat pH 5.0
Gradient: 300 ml von 0.5 M bis 1.1 M NaCl
Frakt. Vol.: 1 ml
Flußgeschw.: 3 min pro Frakt.

6.2.2.4. Bestimmung der Position der unbeladenen tRNA^{Met} im Elutionsprofil der BD-Cellulose pH 3.0

a) BD-Cellulose Säule

Säule: 2.5 x 95 cm
Puffer: 7 M Harnstoff, 0.24 M NaCl pH 3.0
Gradient: 6000 ml von 0.24 M bis 0.4 M NaCl
Frakt. Vol.: 10 ml
Flußgeschw.: 18 min/Frakt.

b) Isolierung der tRNA in den Fraktionen der BD-Cellulose Säule.

In jeder 5. Fraktion wurde die tRNA mit Alkohol gefällt, abzentrifugiert, der Alkohol verblasen und die Proben mit wenig H_2O aufgenommen. Die Konzentration der Proben wurde gemessen.

6.2.2.5. Präparative BD-Cellulose pH 3.0

Säule: 1.4 x 75 cm

Puffer: 0.24 M NaCl, 7 M Harnstoff pH 3.0

Gradient: 1600 ml von 0.24 M bis 0.4 M NaCl

Frakt. Vol.: 4 ml

Flußgeschw.: 3 min pro Frakt.

6.2.3. Enzymatische Spaltungen von ^{32}P -markierter tRNA₃^{Met} und Oligonukleotiden und Auftrennung der Spaltprodukte

Die am häufigsten verwendeten Puffer für die Papierelektrophorese werden abgekürzt geschrieben und wurden folgendermaßen hergestellt:

pH 3.5 5 % Essigsäure

0.5 % Pyridin

pH 3.5 mit Harnstoff 5 % Essigsäure

7 M Harnstoff

pH 1.9 2.5 % Ameisensäure

8.7 % Essigsäure

7 %

7 % Ameisensäure

S bedeutet Spaltbedingungen, T Trennung der Spaltprodukte.

6.2.3.1. Enzymatische Spaltungen der tRNA₃^{Met}

6.2.3.1.1. "T₁-fingerprint"

S: 0.5 A₂₆₀^E tRNA (ca. 2×10^6 cpm) wurden mit 5 µl einer Lösung von 0.2 mg/ml RNAase T₁ in 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7.4 Puffer inkubiert. Inkubation (Ink.): 37° C, 30 min

T: Elektrophorese (EP): Zweidimensional

1. Dimension: Celluloseazetat Papier 3.5 x 60 cm pH 3.5 mit Harnstoff, 5 KV, ca. 1 h.
2. Dimension: DEAE-Cellulose Papier 46 x 85 cm 7 %, 1 KV, ca. 14 h.

6.2.3.1.2. "RNAase A-fingerprint"

S: Die Bedingungen entsprachen weitgehend den in 6.2.3.1.1. beschriebenen. Lediglich die Enzymkonzentration wurde zu 1 mg/ml RNAase A geändert, um den Anteil an zyklischem Phosphat zu vermindern, und die EP in der 2. Dimension betrug bei 1 KV nur ca. 10 h.

6.2.3.2. Methoden zur Ermittlung der Nukleotidzusammensetzung und der Sequenz der Spaltprodukte aus 6.2.3.1.

6.2.3.2.1. Vollständige Spaltungen

Es wurden Spaltungen mit Enzymen und Alkali durchgeführt. Jeweils 0.01 ml der angegebenen Lösungen pro eingetrockneter Probe aus 6.2.3.1. wurden verwendet.

6.2.3.2.1.1. RNAase A

S: 0.05 mg/ml Enzym in 0.01 M EDTA, 0.01 M Tris-HCl pH 7.4

Ink.: 37° C, 15 min

T: EP: DEAE Cellulose Papier 85 cm lang, pH 3.5, 1.2 KV,
ca. 5.5 h.

6.2.3.2.1.2. RNAase T₁

S: 0.1 mg/ml Enzym in 0.01 M EDTA, 0.01 M Tris-HCl pH 7.4

Ink.: 37° C, 30 min

T: EP: DEAE Cellulose Papier 85 cm lang, pH 3.5, 1.2 KV,
ca. 5.5 h.

6.2.3.2.1.3. RNAase U₂

S: 0.1 U/ml Enzym in 0.05 M Na-Azetat, 0.02 M EDTA, 0.1 mg Rinderserumalbumin pro ml pH 4.5 Ink.: 37° C, 2 h

T: EP: DEAE Cellulose Papier 85 cm lang, pH 1.9, 1.5 KV, 5 h.

6.2.3.2.1.4. RNAase T₂

S: 1-5 U/ml Enzym in 0.05 M NH₄-Azetat pH 4.5 Ink.: 37°C, 2 h.

T: EP: Whatman 540 Papier, pH 3.5, 5 KV, 1 h.

6.2.3.2.1.5. Alkali

S: 10 %ige Piperidinlösung Ink.: 100° C, 2 h

T: EP: Whatman 540 Papier, pH 3.5, 5 KV, 1 h.

6.2.3.2.1.6. Blockierung des Nukleotids Up und anschließende Spaltung des Oligonukleotids mit RNAase A

CMCT (N Cyclohexyl-N' (ßmorpholinyl (4) ethyl) carbodiimid-methyl-p toluolsulfonat bindet an die Nukleotide Up (und Gp) und verhindert damit eine Spaltung durch RNAase A neben dem Nukleotid Up. Mit CMCT geblockte T₁-Oligonukleotide werden deshalb nur neben Cp gespalten.

S: 100 mg/ml CMCT in 0.05 M Tris-HCl, 0.005 M EDTA pH 7.5

Ink.: 37° C, 15 h.

Anschließend wurden 10 µl RNAase A (0.2 mg/ml) in 0.002 M

EDTA, 0.02 M Tris-HCl pH 7.4 zugegeben. Ink.: 37° C, 1.5 h.

T: EP Whatman 3 MM Papier, pH 3.5, 6 KV, 30 min.

6.2.3.2.1.7. Bestimmung des 5'-Endes von Oligonukleotiden

Völlige Spaltung mit VPDE (Phosphordiesterase aus Schlangengift) ergibt 5'-Mononukleotide, wobei das 5'-Ende als Nukleosid freigesetzt wird und somit in der ^{32}P -Methode nicht erkannt wird. Der Vergleich der VPDE Spaltung mit einer RNAase T_2 Spaltung liefert das "fehlende" Nukleotid des 5'-Endes.

S: Es wurde, wie in 6.2.3.2.2.2. beschrieben, verfahren, jedoch war die Enzymkonzentration 0.2 mg/ml Ink.: 37°C , 1.5 h.

T: EP Whatman 540 Papier pH 3.5, 6 KV 1 h. oder Dünnschichtchromatografie im System a (s. 6.1.8.)

6.2.3.2.2. Partielle Spaltungen von Oligonukleotiden

6.2.3.2.2.1. Partielle SPDE (Phosphodiesterase aus Milz)

S: 0.02 mg/ml Enzym in 0.002 M EDTA, 0.1 M Na-Azetat, 0.05 TWEEN 80, pH 5.7

Ink.: Raumtemperatur, bis zu 30 min abhängig vom untersuchten Oligonukleotid.

T: EP DEAE Cellulose Papier, pH 1.9, 1 KV, 20 h.

6.2.3.2.2.2. Partielle VPDE

S: Die Proben wurden durch Inkubation mit 10 μl 0.1 N HCl bei 37°C , 1 h decyclisiert. Anschließend wurde das Inkubationsgemisch im Exsikkator getrocknet. Dephosphorylierung der Oli-

gonukleotide erfolgte durch Inkubation mit 10 μ l PME (alkalische Phosphomonoesterase) -Lösung (0.1 mg/ml Enzym in 0.05 M Tris-HCl, 0.01 M $MgCl_2$, pH 8.9) bei 37° C, 1 h. Es folgte kurze EP auf DEAE-Cellulose Papier, 7 %, um Enzym und anorganisches Phosphat zu beseitigen. Die eluierten, dephosphorylierten Oligonukleotide wurden schließlich mit VPDE (0.02 mg/ml Enzym in 0.02 M $MgCl_2$, 0.01 M Tris-HCl, pH 8.9) gespalten. Ink.: Raumtemperatur bis zu 40 min, abhängig vom untersuchten Oligonukleotid.

T: EP DEAE Cellulose Papier, pH 3.5, 1 KV, 20 h.

6.2.3.3. Partielle Spaltung von $tRNA_3^{Met}$ mit RNAase T_1

S: 0.5 A_{260}^E $tRNA_3^{Met}$ wurden mit 5 μ l RNAase T_1 (0.004 mg/ml Enzym in 0.02 M $MgCl_2$, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.5) bei 5° C, 15 min inkubiert.

T: a) Homochromatografie

1. Dimension: EP Celluloseazetat Papier (3.5 x 60 cm), pH 3.5 mit Harnstoff, 6 KV, 1 h.

2. Dimension: Chromatografie Polygram Folie, Homomix b, 55° C, 14 h.

b) Zweidimensionale Gelelektrophorese. s. 6.2.4.

6.2.4. Zweidimensionale Gelelektrophorese

1. Dimension: Sammelgel: 5.7 % Acrylamid in 0.05 M Tris-HCl, 4 M Harnstoff, pH 6.7, 5-6 cm hoch.

Trenngel: 10 % Acrylamid in 0.08 M Tris-Borat, 1 mM EDTA, 4 M Harnstoff, pH 8.3, 20 x 40 cm, 4 mm dick.

EP: 400 V, 24-40 h, 4°C.

2. Dimension: 20 % Acrylamid in 0.08 M Tris-Borat, 1 mM EDTA, 4 M Harnstoff, pH 8.3, 20 x 20 cm, 4 mm dick.

EP: 400 V, 48-72 h, 4° C.

6.2.5. Elution von tRNA Fragmenten aus Acrylamidgelen

Diejenigen Gelbereiche, welche tRNA Fragmente enthielten, wurden - entsprechend dem Autoradiogramm - ausgestantzt und kleingeschnitten. Röhrchen für die Rundgelelektrophorese (Durchmesser 7 mm) wurden unten mit einem DEAE-Cellulose Papierfilter und Dialysierschlauch verschlossen. Die kleingeschnittenen Gelpartikel wurden in die Röhrchen gefüllt und die Gelelektrophoreseapparatur mit 0.02 M Na-Azetat, 0.001 M EDTA, 0.04 M Tris-Azetat pH 8 Puffer gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V, 2 h. Die tRNA Fragmente wurden von den DEAE-Cellulose Filtern mit 30 %igem Triäthylammoniumcarbonat pH 9 eluiert.

7. Materialien

7.1.

tRNA aus Brauereihefe wurde von der Fa. Boehringer/Mannheim bezogen.

7.2.

Isotope: ^{14}C -Methionin (59 Ci/Mol und 10 Ci/Mol), ^3H -Methionin (150 Ci/Mol und 8000 Ci/Mol) ^{32}P -Phosphat und ^{14}C -Algenproteinhydrolysat wurden von der Fa. Amersham-Buchler/Braunschweig gekauft.

7.3.

Enzyme: Methionyl-tRNA-Synthetase wurde durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Fällung (45-55 %) eines Heferohextraktes gewonnen und war ein Geschenk von Herrn Dr. Hirsch. RNAasen T_1 , T_2 und U_2 wurden von der Fa. Sankyo/Tokyo, VPDE, SPDE, PME und RNAase A von der Fa. Worthington/Freehold bezogen.

7.4.

Adsorptionsmittel für die Säulenchromatografie.

7.4.1.

DEAE Cellulose der Fa. Serva/Heidelberg wurde 15 min. mit 0.5 N NaOH gerührt, neutral gewaschen, 15 min. mit 0.5 N HCl gerührt, wieder neutral gewaschen und in dem entsprechenden Puffer äquilibriert. DE 52 der Fa. Whatman/Maidstone wurde unbehandelt verwendet.

7.4.2.

DEAE Sephadex A 50 der Fa. Pharmacia/Uppsala wurde wie DEAE Cellulose vorbehandelt.

7.4.3.

BD Cellulose der Fa. Serva wurde folgendermaßen vorbehandelt. Material für die Chromatografie bei pH 3.0 wurde mit 2 M NaCl, 7 M Harnstoff, 20 % Äthanol pH 3.0 gewaschen bis im Eluat die Extinktion unter $0.02 A_{260}$ E lag. Anschließend wurde mit Ausgangspuffer pH 3.0 äquilibriert. BD Cellulose für die Chromatografie bei pH 5.0 wurde mit 2 M NaCl, 20 % Äthanol pH 5.0 Puffer gewaschen, bis die Extinktion des Eluats unter $0.02 A_{260}$ E gesunken war. Anschließend wurde mit pH 5.0 Puffer äquilibriert.

7.4.4.

RPC Systeme: Chromosorb W und G waren von Fa. Johns/Manville Aliquat 204 (Dimethyldilaurylammoniumchlorid) war ein Geschenk der Fa. General Mills, Kankakee, Trioctylpropylammoniumbromid wurde von der Fa. Kodak/Rochester bezogen. RPC 3 und RPC 4 wurden nach den Vorschriften von Kelmers (112) hergestellt.

7.4.5.

Dünnschichtchromatografie: Es wurden Celluloseplatten (20 x 20 cm) ohne Fluoreszenzindikator der Fa. Merck/Darmstadt verwendet. Für die Homöochromatografie wurden Polygram CEL 300 DEAE/HR-2/15 Folien (20 x 40 cm) der Fa. Macherey-Nagel/Düren benutzt.

7.4.6.

Filter-, Elektrophorese- und Chromatografiepapiere. Glasfaserfilter GF/C und Papiere der Typen 3 MM, 1, 540 und DE 81 waren von der Fa. Whatman, von der Fa. Schleicher und Schüll/Dassel das Papier 2043 b Mgl.

7.4.7. Gelelektrophorese

Acrylamid und N, N'-Methylenbisacrylamid wurden von der Fa. Serva bezogen.

7.4.8.

Röntgenfilm für die Autoradiografie war Kodak RPS 14.

7.4.9. Reagentien

CMCT wurde von der Fa. Fluka/Basel besorgt.

7.4.10. Hefestamm

Zur Anzucht von ^{32}P -markierter Hefe wurde der Stamm *S. cerevisiae* C 836 verwendet.

8. Literaturverzeichnis

- (1) Barrell, B.G. und Clark, B.F.C. (1974) Handbook of Nucl. Acid Sequences, Joynson-Bruvvers Ltd. Oxford
- (2) Holley, R.W., Apgar, J., Everett, G.A., Madison, J.T., Marquisse, S.H., Merrill, J., Penwick, R. und Zamir, A. (1965) Science 147, 1462-1465
- (3) Suddath, F.L., Quigley, G.J., Mc Pherson, A., Sneden, D., Kim, S.H. und Rich, A. (1974) Nature 248, 20-24
- (4) Kim, S.H., Suddadt, F.L., Quigley, G.J., Mc Pherson, A., Sussman, J.L., Wang, A.H.J., Seeman, N.C. und Rich, A. (1974) Science 185, 435-440
- (5) Robertus, J.D., Ladner, J.E., Finch, J.T., Rhodes, D., Brown, R.D., Clark, B.F.C. und Klug, A. (1974) Nature 250, 546-551
- (6) Kim, S.H., Sussman, J.L., Suddath, F.L., Quigley, G.J., Mc Pherson, A., Wang, A.H.J., Seeman, N.C. und Rich, A. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 4970-4974
- (7) Rich, A. (1974) Biochimie 56, 1441-1449
- (8) Littauer, U.Z. und Inouye, H. (1973) Ann. Rev. Biochem. 42, 439-470
- (9) Schäfer, K.P. und S811, D. (1974) Biochimie 56, 795-804
- (10) Robertson, H.D., Altman, S. und Smith, J.D. (1972) J. Biol. Chem. 247, 5243-5251
- (11) Spahr, P.F. und Schlesinger, D. (1963) J. Biol. Chem. 238, 2251-2253
- (12) Singer, M. und Tolbert, G. (1965) Biochemistry 4, 1319-1330
- (13) Schedl et al. (1974) Brookhaven Symposium in Biology 27
- (14) Nakanishi, K., Furutachi, N., Funamizu, M., Grunberger, D. und Weinstein, I.B. (1970) J. Am. Chem. Soc. 92, 7617-7619
- (15) Cortese, R., Kammen, H.O., Spengler, S.J. und Ames, B.N. (1974) J. Biol. Chem. 249, 1103-1108

- (16) Biezunski, N., Givon, D., Littauer, U.Z. (1970) Biochim. Biophys. Acta 199, 382-393
- (17) Marmor, J.B., Dickerman, H.W. und Peterkofsky, A. (1971) J. Biol. Chem. 246, 3464-3473
- (18) Björk, G.R. und Isaksson, L.A. (1970) J. Mol. Biol. 51, 83-100
- (19) Svenson, I., Isaksson, L. und Henningsson, A. (1971) Biochim. Biophys. Acta 238, 331-337
- (20) Yoshida, M., Takeishi, K. und Ukita, T. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 39, 852-857
- (21) Zachau, H.G., Dütting, D. und Feldmann, H. (1966) Z. Physiol. Chem. 347, 212-235
- (22) Singer, C.E., Smith, G.R., Cortese, R. und Ames, B.N. (1972) Nature NB 238, 72-74
- (23) Roe, B., Michael, M. und Dudock, B. (1973) Natur NB 246, 135-139
- (24) Altman, S. und Smith, J.D. (1971) Nature NB 233, 35-39
- (25) Carbon et al. (1974) Brookhaven Symposium in Biology 27
- (26) Barrell, B.G., Seidman, J.G., Guthrie, C. und McClain (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 413-416
- (27) Haselkorn, R. und Rothman-Denes, L.B. (1973) Ann. Rev. Biochem. 42, 397-438
- (28) Ochoa, S. und Mazumder, R. (1974) in The Enzymes (Boyer) Acad. Press X, 1-51
- (29) Lucas-Lenard, J. und Beres, L. (1974) in s. (28) X, 53-86
- (30) Tate, W.P. und Caskey, C.T. (1974) in s. (28) X, 87-118
- (31) Smith, D.W.E. und McNamara, A.L. (1972) Biochim. Biophys. Acta 269, 67-77
- (32) Chavancy, G., Daillie, J. und Garel, J.P. (1971) Biochimie 53, 1187-1194
- (33) Harris, C.L., Titchener, E.D. und Cline, A.L. (1970) J. Bacteriology 100, 1322-1327
- (34) Rosenberg, A.H. und Geftter, M.L. (1969) J. Mol. Biol. 46, 581-584

- (35) Chuang, R.Y.L. und Doi, R.H. (1972) J. Biol. Chem. 247, 3476-3484
- (36) Bick, M.D. und Strehler, B.L. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 224-228
- (37) Ortwerth, B.J. (1971) Biochemistry 10, 4190-4197
- (38) Sueoka, N. und Kano-Sueoka, T. (1970) Progr. Nucl. Acid Res. MB 10, 23-55
- (39) Daniel, V., Sarid, S. und Littauer, U.Z. (1970) Science 167, 1682-1688
- (40) Sager, R. (1972) in Cytoplasmic Genes and Organelles, Acad. Press, New York, 306 und 242
- (41) Borst, P. (1972) Ann. Rev. Biochem. 41, 334-376
- (42) Wu, M., Davidson, N., Attardi, G. und Aloni, Y. (1972) J. Mol. Biol. 71, 81-93
- (43) Stewart, T.S., Roberts, R.J. und Stominger, J.L. (1971) Nature NB 230, 36-38
- (44) Roberts, R.J. (1972) Nature NB 237, 44-45
- (45) Gentner, N. und Berg, P. (1971) Fed. Proc. 30, 1218 (Abstract)
- (46) Nesbitt, J.A. III, und Lennarz, W.J. (1968) J. Biol. Chem. 243, 3088-3095
- (47) Gould, R.M., Thornton, M.P., Liepkalns, V. und Lennarz, W.J. (1968) J. Biol. Chem. 243, 3096-3104
- (48) Soffer, R.L. (1970) J. Biol. Chem. 245, 731-737
- (49) Soffer, R.L. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1602-1606
- (50) Soffer, R.L. und Capra, J.D. (1971) Nature NB 233, 44-45
- (51) Goz, B. und Voytek, P. (1972) J. Biol. Chem. 247, 5892-5897
- (52) Kaji, H., Novelli, G.D. und Kaji, A. (1963) Biochim. Biophys. Acta 76, 474-477
- (53) Gill, D.M. (1967) Biochim. Biophys. Acta 145, 792-805
- (54) Kaji, H. (1968) Biochemistry 7, 3844-3850
- (55) Soffer, R.L. und Horinishi, H. (1969) J. Mol. Biol. 43, 163-175

- (56) Dupras, M. und DeLamirande, G. (1970) Cancer Res. 30, 1506
- (57) Soffer, R.L. und Mendelsohn, N. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 252-258
- (58) Soffer, R.L. (1968) Biochim. Biophys. Acta 155, 228-240
- (59) Smith, J.D. (1972) Ann. Rev. Genetics 6, 235-256
- (60) Carbon, J. Squires, C. und Hill, C.W. (1969) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 505-512
- (61) Goodman, H.M., Abelson, J., Landy, A., Brenner, S. und Smith, J.D. (1968) Nature 217, 1019-1024
- (62) Brenner, M. und Ames, B.N. (1972) J. Biol. Chem. 247, 1080-1088
- (63) Lewis, J.A. und Ames, B.N. (1972) J. Mol. Biol. 66, 131-142
- (64) Calvo, J.M. und Fink, G.R. (1971) Ann. Rev. Biochem. 40, 943-968
- (65) Iaccarino, M. und Berg, P. (1971) J. Bacteriol. 105, 527-537
- (66) Alexander, R.R., Calvo, J.M. und Freundlich, M. (1971) J. Bacteriol. 106, 213-220
- (67) Mikulka, T.W., Stieglitz, B.I. und Calvo, J.M. (1972) J. Bacteriol. 109, 584-593
- (68) Low, B., Grates, F., Goldstein, T. und Söll, D. (1971) J. Bacteriol. 108, 742-750
- (69) Brenner, M. und Ames, B.N. (1971) in Metabolic Pathways (Vogel), Acad. Press New York 5, 349-387
- (70) Doolittle, W.F. und Yanofsky, C. (1968) J. Bacteriol. 95, 1283-1294
- (71) Mosteller, R.D. und Yanofsky, C. (1971) J. Bacteriol. 105, 268-275
- (72) Squires, C.L., Rose, J.K. und Yanofsky, C., Huey-Lang Yang und Zubay, G. (1973) Nature NB 245, 131-133
- (73) Rose, J.K., Squires, C.L. und Yanofsky, C., Huey-Lang Yang und Zubay, G. (1973) Nature NB 245, 133-137

- (74) Lengyel, P. und Söll, D. (1969) *Bacteriol Rev.* 33, 264-301
- (75) Marcker, K.A. und Sanger, F. (1964) *J. Mol. Biol.* 8, 835-840
- (76) Samuel, C.E., D'Ari, L. und Rabinowitz, J.C. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 5155-5121
- (77) Samuel, C.E. und Rabinowitz, J.C. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 6856-6865
- (78) Samuel, C.E. und Rabinowitz, J.C. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 1198-1206
- (79) Smith, A.E. und Marcker, K.A. (1968) *J. Mol. Biol.* 38, 241-243
- (80) Galper, J.B. und Darnell, J.E. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 34, 205-214
- (81) Leis, J.P. und Keller, E.B. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 416-421
- (82) Schwartz, J.H., Meyer, R., Eisenstadt, J.M. und Brawermann, G. (1967) *J. Mol. Biol.* 25, 571-574
- (83) Burkard, G., Eclancher, B. und Weil, J.H. (1969) *FEBS Letters* 4, 285-287
- (84) Leis, J.P. und Keller, E.B. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 67, 1593-1599
- (85) Hayashi, H., Fischer, H. und Söll, D. (1969) *Biochemistry* 8, 3680-3686
- (86) Feldmann, H. und Falter, H. (1971) *Eur. J. Biochem.* 18, 573-581
- (87) Dube, S.K., Marcker, K.A., Clark, B.F.C. und Cory, S. (1968) *Nature* 218, 232-233
- (88) Cory, S., Marcker, K.A., Dube, S.K. und Clark, B.F.C. (1968) *Nature* 220, 1039-1040
- (89) Takeishi, K., Ukita, T. und Nishimura, S. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 5761-5769
- (90) RajBhandary, U.L. und Ghosh, H.P. (1968) *J. Biol. Chem.* 244, 1104-1113
- (91) Smith, A.E. und Marcker, K.A. (1970) *Nature* 226, 607-610

- (92) Kerwar, S.S., Spears, C. und Weissbach, H. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 78-84
- (93) Tarrago, A., Monasterio, O. und Allende, J.E. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 765-773
- (94) Caskey, C.T., Redfield, R. und Weissbach, H. (1967) Arch. Biochem. Biophysics 120, 119-123
- (95) Tsuzukida, Y., Isemura, S., Kitano, T. und Matsui, K. (1969) J. Biochemistry 66, 573-579
- (96) Brown, J.C. und Smith, A.E. (1970) Nature, 226, 610-612
- (97) Bhadury, S., Chatterjee, N.K., Bose, K.K. und Gupta, N.K. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 402-407
- (98) Wilson, D.B. und Dintzis, H.M. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 66, 1282-1289
- (99) Jackson, R. und Hunter, T. (1970) Nature 227, 672-676
- (100) Wigglesworth, D.T. und Dixon, G.H. (1970) Nature 227, 676-680
- (101) Yoshida, A., Watanabe, S. und Morris, J. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 1600-1607
- (102) Rajbhandary, U.L. und Kumar, A. (1970) J. Mol. Biol. 50, 707-711
- (103) Marcus, A., Weeks, D.P., Leis, J.P. und Keller, E.B. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 1681-1687
- (104) Housman, D., Jacobs-Lorena, M., Rajbhandary, U.L. und Lodish, H.F. (1970) Nature 227, 913-918
- (105) Gupta, N.K., Chatterjee, K., Bose, K., Bhadury, S. und Chung, A. (1970) J. Mol. Biol. 54, 145-154
- (106) Gillam, J., Millward, S., Blew, D., v. Tigerström, M., Wimmer, E. und Tener, G.M. (1967) Biochemistry 6, 3043-3056
- (107) Feldmann, H., Haring, H. und Gruhl, H. (1971) Z. Physiol. Chem. 352, 1231-1247
- (108) Weiss, J.A., Pearson, R.L. und Kelmers, A.D. (1968) Biochemistry 7, 3479-3487
- (109) Streeck, R. und Zachau, H.G. (1972) Eur. J. Biochem. 30, 382-391

- (110) Batt, R.D., Martin, J.K., Floeser, J.M., Murray, J.
(1954) *J. Am. Chem. Soc.* 76, 3663-3665
- (111) Simsek, M. und RajBandary, U.L. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49, 508-515
- (112) Sanger, F., Brownlee, G.G. und Barrell, B.G. (1965)
J. Mol. Biol. 13, 373-398
- (113) Barrell, B.G. (1971) in *Procedures in Nucleic Acid Res.*
(Cantoni, G.L. und Davies, D.R.) 2, 751-779 Harper and
Row, New York
- (114) Gillam, J., Blew, D., Warrington, R.C., v. Tigerström, M.
und Tener, G.M. (1968) *Biochemistry* 7, 3459-3468
- (115) Fittler, F., Kruppa, J. und Zachau, H.G. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 277, 513-522
- (116) De Wachter, R. und Fiers, W. (1971) *Meth. Enzymol.* 21,
167-178
- (117) Varricchio, F. und Seno, T. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 51, 522-528
- (118) Hindley, J. und Staples, D.H. (1969) *Nature* 224, 964-970
- (119) Philippsen, P. und Zachau, H.G. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 277, 523-538
- (120) Fradin, A., Gruhl, H. und Feldmann, H. (1975) *FEBS Letters* 50, 185-189
- (121) Söll, D.G. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 3063-3067
- (122) Levitt, M. (1969) *Nature* 124, 2759-2763
- (123) Piper, P.W. und Clark, B.F.C. (1974) *FEBS Letters* 47,
56-59
- (124) Meixner, E. und Feldmann, H. unveröffentlicht
- (125) Petrisant, G. und Boissnard, M. (1974) *Biochimie* 56,
787-790
- (126) Kisselev, L.L. und Favorova, O.O. (1974) *Advances Enzymol.* 40, 141-238
- (127) Simsek, M., RajBhandar, U.L., Boissnard, M. und Petrisant,
G. (1974) *Nature* 247, 518-520

- (128) Ebel, J.P., Giege, R., Bonnet, J., Kern, D., Befort, N.,
Bollack, C., Fasiolo, F., Gangloff, J. und Dirheimer, G.
(1973) Biochimie 55, 547-557
- (129) Europ. J. Biochem. (1970), 15, 203-208
ibid. (1971) 18, 588
- (130) Bray, G.A. (1960) Anal. Biochem. 1, 279-285

9. Verzeichnis der Abkürzungen

A ₂₆₀	Extinktion bei 260 nm und 1 cm Lichtweg
BD-Cellulose	benzoylierte DEAE-Cellulose
DEAE	Diäthylaminoäthyl
RPC	Reverse Phase Chromatography
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
RNAase T ₁	Ribonuklease aus <i>Aspergillus oryzae</i> (EC 3.1.4.8.)
RNAase T ₂	Ribonuklease aus <i>Aspergillus oryzae</i> (EC 3.1.4.23)
RNAase A	Ribonuklease aus Rinderpankreas (EC 3.1.4.22)
RNAase U ₂	Ribonuklease aus <i>Ustilago sphaerogena</i>
PME	Alkalische Phosphatase (Kalb) (EC 3.1.3.1)
VPDE	Schlangengift-Phosphodiesterase aus <i>Crotalus adamanteus</i> (EC 3.1.4.1)
SPDE	Phosphodiesterase aus Rindermilz (EC 3.1.4.18)
MRS	Methionyl-tRNA-Synthetase (EC 6.1.1.10)

Die übrigen Abkürzungen folgen den Regeln der IUPAC-IUB (129)

Lebenslauf

- 2.8.1941 geboren in Pähl/Obb.
Eltern: Dr.jur. Heinrich Gruhl (gef. 1943)
Waltraut, geb. Naumann
3 Geschwister
- 1947-1951 Volksschule Herrsching a.A.
- 1951-1953 Private Oberschule Herrsching a.A.
- 1953-1954 Oberrealschule Pasing
- 1954-1961 Oberrealschule Weilheim/Obb.
Abitur
- 1961-1963 Bundeswehr
- 1963-1969 Studium der Chemie an der Universität München
Diplomhauptprüfung
- 1969-1971 Diplomarbeit am Institut für Physiologische Chemie
und Physikalische Biochemie der Universität Mün-
chen
- 1971-1975 Doktorarbeit am Institut für Physiologische Che-
mie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der
Universität München

